Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr.med.H.Remmer

Morphometrische Analysen praeneoplastischer, ATP'ase freier Zellareale zur Frühbeurteilung der hepatocarcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin und deren Beeinflussung durch Fremdstoffe.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Stöckle
aus Geislingen /Steige

1979

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr.med.H.Remmer

Morphometrische Analysen praeneoplastischer, ATP'ase freier Zellareale zur Frühbeurteilung der hepatocarcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin und deren Beeinflussung durch Fremdstoffe.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Stöckle
aus Geislingen /Steige

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Remmer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-W. Altmann

Herrn Professor Dr. med. W. Kunz möchte ich für die Anregung zu vorliegender Arbeit und für die fördernde Unterstützung sehr danken.

Fräulein Ulrike Heni danke ich sehr herzlich für ihre bereitwillige Hilfe bei der praktischen Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit.

Dank gebührt auch Herrn Professor Dr. Weber, Leiter der Abteilung für Versuchsplanung am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg für die Betreuung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0006

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Material und Versuchstiere	9
2.1.1.	Chemikalien	9
2.1.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	10
2.2.	Methoden der in vivo Versuche	10
2.2.1.	Vorbehandlung der Tiere	10
2.2.2.	Aufbereitung der Leber	11
2.2.3.	Enzymfärbung der Adenosintriphosphatase und der Glucose-6-Phosphatase	12
2.2.4.	Meßmethode	13
2.2.5.	Glucose-6-Phosphatase Bestimmung im Homogenat	18
2.3.	Methoden der in vitro Versuche	21
2.3.1.	Mikrosomenpräparation	21
2.3.2.	Bestimmung des mikrosomalen Proteins nach Lowry	21
2.3.3.	Messung der Cytochrome b 5 und P 450	22
2.3.4.	Nitroanisol-Demethylierung	23
2.3.5.	DMNA-Demethylierung	23
2.3.6.	Alkylierung von Proteinen	24
2.4.	Statistik	26
3.	ERGEBNISSE	27
3.1.	Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen der DÄNA-Carcinogenese	27

3.1.1. Möglichkeiten einer frühzeitigen und kontinuierlichen Erfassung von Frühstadien des Tumorgeschehens 27

3.1.2. Zeit-Wirkungs-Beziehungen bei kontinuierlicher DÄNA-Applikation 34

3.1.3. Theoretische Ableitung der Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung präcanceröser Veränderungen 36

3.1.4. Experimentelle Verifizierung der Gültigkeit von $dxt^{2,3}=K_d$ für Präcancerosen 39

3.1.5. Graphische Ableitung der Dosis-Zeit-Beziehung $dxt^{2,3}=K_d$ 42

3.1.6. Zeitabhängige Entwicklung der ATP'ase-Defekte nach Absetzen des Carcinogens 45

3.2. Beeinflussung der DÄNA-Carcinogenese durch Induktoren und Inhibitoren der oxidativen Hydroxylierung 52

3.2.1. Beeinflussung der DÄNA-Wirkung durch Phenobarbital 52

3.2.2. Einfluß von Phenobarbital auf die Entwicklung präneoplastischer Veränderungen nach abgeschlossener DÄNA-Exposition 58

3.2.3. Wirkung von 3-Methylcholanthren auf die DÄNA-Carcinogenese 61

3.2.4. Beeinflussung DÄNA-bedingter Präneoplasien durch Halothan 63

3.2.5.	Beeinflussung der DÄNA-Carcinogenese durch SKF 525 A - Inhibition	64
3.2.6.	Beeinflussung der DÄNA-Wirkung durch Metyrapon	66
3.2.7.	Einfluß von Kobaltchlorid auf die DÄNA-Carcinogenese	68
3.3.	Einfluß der Behandlung mit DÄNA , Phenobarbital und DÄNA sowie Halothan und DÄNA auf die Nitrosaminmetabolisierung und Alkylierungsintensität im mikrosomalen in vitro System bei in vivo Vorbehandlung mit DÄNA,Phenobarbital und Halothan	69
4.	DISKUSSION	72
4.1.	Zur Analyse der DÄNA-Wirkungskinetik	72
4.2.	Zur Beeinflussung der DÄNA-Carcinogenese durch Induktoren und Inhibitoren der oxidativen Hydroxylierung	79
5.	ZUSAMMENFASSUNG	85
6.	TABELLARISCHER ANHANG UND STATISTIK	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS	117

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLIK

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP'ase	Adenosin-5'-triphosphatase
DÄNA	Diäthylnitrosamin
DMNA	Dimethylnitrosamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-P'ase	Glukose-6-Phosphatase
KG	Körpergewicht
3-MC	3-Methylcholanthren
Metyrapon	2-Methyl-1,2-di(3-pyridyl)-propanon
NADH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
RNS	Ribonukleinsäure
SKF 525 A	2-Diäthylaminoäthyl-2,2-diphenylvalerat HCL
TCA	Trichloressigsäure
D	mit DÄNA behandelte Versuchstiere
DPh	mit DÄNA und Phenobarbital simultan behandelte Versuchstiere
DPH	Phenobarbital-Applikation nach abgeschlossener DÄNA-Exposition
DMC	simultane Behandlung mit DÄNA und 3-MC
DH	simultane Behandlung mit DÄNA und Halothan
DS	simultane Applikation von DÄNA und SKF 525 A
DSPh	simultane Behandlung mit SKF,DÄNA und Phenobarbital
DM	simultane Applikation von DÄNA und Metyrapon
DCo	simultane Behandlung mit DÄNA und Cobaltchlorid

EINLEITUNG

Nitrosamine fanden bis zur Aufdeckung ihrer toxischen und krebserzeugenden Eigenschaften durch Magee & Barnes (1954, 1959) weite Verbreitung in der Industrie als Lösungsmittel und Schmierstoffe.

Durch einmalige Gaben von 20-40 mg/kg Körpergewicht konnten 1954 Magee & Barnes akute Leberzellnekrosen mit teilweise letalem Ausgang im Tierexperiment erzeugen. Unter chronischer Anwendung kleiner Dosen konnte die krebserzeugende Wirkung, insbesondere die Bildung hepatocellulärer Carcinome, bei Ratten nachgewiesen werden.

Obwohl eine direkte Exposition nach der Entfernung von Nitrosaminen aus der Arbeitswelt nicht mehr gegeben war, erlangten besonders die einfachsten Vertreter wie Dimethylnitrosamin und Diäthylnitrosamin aufgrund ihrer übersehbaren Struktur und Metabolisierungsmöglichkeiten eminente Bedeutung für die Aufdeckung der Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und carcinogener Wirkung. Erneute Aktualität gewannen die Nitrosamine durch Untersuchungen von Magee & Barnes (1967), Sander (1968, 1969), Eisenbrandt & Marquardt (1969), sowie Mirvish (1970), welche die endogene Entstehung von Nitrosaminen aus sekundären Aminen und Nitrit beschreiben, und damit möglicherweise die Bedeutung derartiger Substanzen für die Humancarcinogenese aufzeigen. Beide Substanzgruppen sind in Genuß- und Nahrungsmitteln enthalten, so sekundäre Amine in Fischprodukten, Wein, Tabak, Zahnpasta etc., Nitrite entstehen durch Reduktion aus ubiquitär verbreiteten Nitraten.

Die Nitrosierung tertiärer Amine beschrieb 1974 Lijinsky unter Verwendung verschiedener Arzneimittel, u.a. Aminopyrine, Oxytetracyclin, welche bei einem pH-Optimum von 3-4, also unter Bedingungen wie sie im Magen vorherrschen, in Anwesenheit von Nitrit Nitrosamine freisetzen können. Tatsächlich konnten Lijinsky et al. 1973 durch chronische Gaben von Nitrit und Aminopyrin in Ratten Lebertumoren induzieren. Die Reaktion von Nitrit mit Aminopyrin kann durch Ascorbinsäure verhindert werden, weshalb die Kombination von Aminopyrin-haltigen Präparaten mit Ascorbinsäure von der WHO empfohlen wird. Eine weitere Beeinflussung der Nitrosamincarcinogenese erscheint unter Berücksichtigung der Metabolisierung von Nitrosaminen nach ihrer intragastralen Entstehung bzw. exogenen Aufnahme möglich. Versuche von Druckrey et al. (1967) zeigten für verschieden substituierte Nitrosamine eine unabhängig vom Applikationsort spezifische Organotropie. Die Eigenschaft, nicht am Ort der höchsten Konzentration Entartungsreaktionen wie z.B. Sarkome nach subkutaner Injektion auszulösen, sondern auf entfernte Organe wie z.B. Leber einzuwirken, machte eine cancerogene Wirkung des unveränderten Nitrosaminmoleküls eher unwahrscheinlich.
Vielmehr bedürfen Nitrosamine als sekundäre Carcinogene mit wenigen Ausnahmen wie z.B. Methylnitroso-n-Guanidin der enzymatischen Umwandlung, wobei die Organotropie durch organspezifische Hydroxylasen erklärt wird.(Dutton & Heath, 1956; Druckrey, 1966). So wird das Dimethylnitrosamin und Diäthylnitrosamin Cytochrom-P 450-abhängig am a-C-Atom hydroxyliert und der Hydroxyalkylrest als Aldehyd, im Falle des Dimethylnitrosamin (DMNA) als Formaldehyd,abgespalten (siehe Abb. 1). Das verbliebene Monoalkylnitrosamin lagert sich in ein Alkyldiazohydroxid um und zerfällt

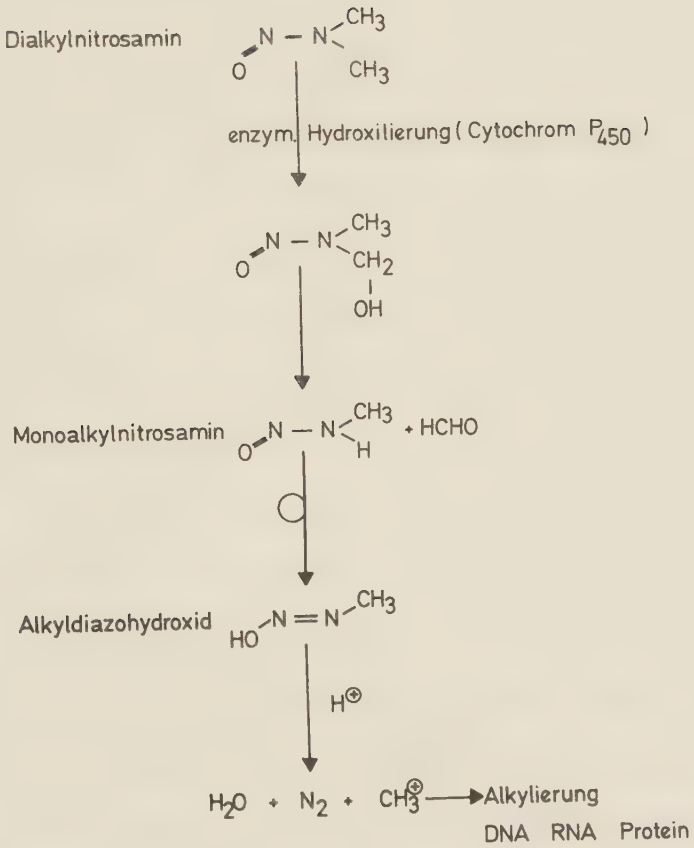


Abb. 1 : Postulierter Aktivierungsmechanismus von Dimethylnitrosamin .

unter Aufnahme eines Protons in H_2O, N_2 und ein Carbeniumion, welches für die Alkylierung von Makromolekülen wie Proteine und Nukleinsäuren verantwortlich gemacht wird.

Der Nachweis von 7-Methyl-Guanin im RNS-Hydrolysat führte zu der Annahme einer kausalen Beziehung der Methylierung von Guanin zur Carcinogenese.(Magee & Farber, 1962). Dies erscheint jedoch fraglich, da zwischen der Alkylierung von Guanin und der Tumorinzidenz keine Korrelation besteht (Swann , 1971), zudem entsteht 7-Methyl-Guanin in vergleichbaren Mengen auch in Organen, welche von der Carcinogenese ausgenommen sind (Krüger, 1971), die Organotropie korreliert also nicht mit dem Auftreten von 7-Methyl-Guanin.

Als zweithäufigste alkylierte Base wird 6-O-Methyl-Guanin vorgefunden; sie verändert im Unterschied zu 7-Methyl-Guanin die Codierungseigenschaften von Guanin, indem sich 6-O-Methyl-Guanin mit Uracil anstatt mit der komplementären Base Cytosin paart (Gerchmann & Ludlum, 1973) und somit an der carcinogen Transformation beteiligt sein könnte. Eine Möglichkeit der Einflußnahme auf das carcinogene Geschehen vor der Transformation liegt in der Veränderung des Initialschritts, der P 450-abhängigen mikrosomalen Hydroxylierung als Voraussetzung für die Entstehung des "ultimate carcinogen". Hierzu stehen uns eine Reihe von Pharmaka mit bekannter induzierender bzw. inhibierender Wirkung zur Verfügung. Ein klassischer Vertreter der Induktion mikrosomaler Metabolisierung ist Phenobarbital, dessen unspezifisch stimulierende Wirkung auf den Abbau verschiedenster Pharmaka durch Induktion mischfunktioneller Oxidasen und Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums der

Leberzelle von Remmer (1959, 1962, 1963, 1965) beschrieben wurde. Die Intensivierung der Initialreaktion des Dimethylnitrosamin- bzw. Diäthylnitrosamin (DÄNA)-Metabolismus ließe eine Steigerung von Alkylierung und Tumorrate, umgekehrt ihre Hemmung eine Reduktion der Carcinogenese erwarten. Diese Vorstellung konnte im bakteriellen Testsystem bestätigt werden, wo eine gesteigerte oxidative Demethylierungsrate zu einer erhöhten Mutationsrate führte.(Czygan et al., 1973).

Im Widerspruch zu diesem Befund stehen tierexperimentelle Untersuchungen von Kunz et al. (1967, 1969), bei denen Diäthylnitrosamin zusammen mit Phenobarbital eine signifikant verminderte Tumorausbeute gegenüber der alleinigen Nitrosaminapplikation ergaben. In die gleiche Richtung weisen Versuche, bei welchen andere Induktorsubstanzen wie 3-Methylcholanthren (Hoch-Ligeti et al., 1969) und polychlorierte Biphenyle (Makiuara et al., 1974) mit Nitrosaminen zur Anwendung kamen. Dagegen führten Nitrosamine zusammen mit Inhibitoren der P 450-Funktion wie Halothan zu gesteigerter Bildung hepatocellulärer Tumoren (Kunz et al., 1969).

Um einer Deutung dieser kontroversen Befunde näherzukommen, fanden in der vorliegenden Arbeit Induktoren und Inhibitoren mit spezifischen Angriffsorten in verschiedener Dosierung und zeitlicher Verabfolgung im Tierversuch Verwendung. Als Vertreter der Nitrosamine wurden für in vitro-Versuche DMNA, für in vivo-Versuche DÄNA gewählt. Aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit, ihrer vollständigen und raschen Resorption nach oraler Gabe ist eine exakte Dosierung ohne Wirkungsverlust oder -verzögerung durch Ablagerung im Fettgewebe möglich.

Demzufolge kommen sie in der Leber rasch und streng dosisabhängig zur Wirkung. Wegen der höheren organspezifischen Tumorrate, vergleichsweise geringeren Flüchtigkeit und bedingt durch günstige physikalisch-chemische Eigenschaften, welche eine exakte Beurteilung der pharmakologischen Wirkung ermöglichen, wurde DÄNA für in vivo-Versuche bevorzugt. Anhand der Tumorausbeute konnte Druckrey 1963 Dosis-Zeit-Beziehungen mit auffallend hoher Präzision aufstellen. In Durchfütterungsversuchen mit variierten täglichen Einzeldosen von 0,075 mg/kg Körpergewicht bis 14,2 mg/kg KG war die für einen definierten Effekt (z.B. Tumortastbefund) benötigte Gesamtdosis D nicht konstant gemäß der Gesetzmäßigkeit einer Summationswirkung D = Einzeldosis d x Zeit t, sondern nahm bei Kleinerwerden der Einzeldosis und längerer Applikationszeit ab nach der Gesetzmäßigkeit $D = d^{0,57}$ x konst. Aus den tierexperimentellen Daten ergab sich eine Dosis-Zeit-Gesetzmäßigkeit $d \times t^{2,3}$ = konst. Demnach war bei kleineren Einzeldosen die für die Tumorbildung benötigte Zeit kürzer als nach der reziprokproportionalen Dosis-Zeit-Abhängigkeit d x t = konst. zu erwarten wäre. Aufgrund dieser Verstärkerwirkung der Zeit ist z.B. bei Halbierung der DÄNA-Einzeldosis nicht die doppelte, sondern nur die 1,35-fache Zeit zur Tumormanifestation nötig. Aus der gleichartigen Normalverteilung der zum Auftreten von Tumoren benötigten Expositionszeiten, welche für alle Dosisgruppen bei Eintragung in das Wahrscheinlichkeitsnetz zu gleichen Steigungen der Regressionsgeraden führten, folgerte Druckrey für alle Dosierungen denselben Wirkungsmechanismus. Die ungewöhnliche Steilheit der Regressionsgeraden führte er

auf einen Wirkungsmechanismus im Sinne der Mehrtreffertheorie zurück. Eine mögliche Erklärung bietet die Entstehung somatischer Mutationen durch Alkylierung cytoplasmatischer und nukleärer Nukleinsäuren, was zu Störungen oder Ausfällen der Synthese bestimmter Proteine führen würde. Solche Syntheseausfälle wurden 1955 von Weber und Cantero mit dem Verlust der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in Hepatomen und von Weiler 1956 mit dem Fehlen des organspezifischen Antigens in Carcinomgeweben beschrieben. Bei systematischen Enzymanalysen fanden Morris & Pitot den unregelmäßigen Ausfall zahlreicher Enzyme in Hepatomen. Mit enzymhistochemischen Methoden konnten dann Goessner & Friedrich-Freksa 1964 schon in der präcancerösen Phase Zellnester mit irreversiblen Glucose-6-Phosphatase-Verlusten nachweisen. Sie erhielten nach wenigen Wochen DÄNA-Applikation klar abgrenzbare Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase)-freie Areale, sogenannte Inseln, welche histologisch allerdings nicht vom umliegenden Normalgewebe zu unterscheiden waren. Sie sind identisch mit den von Bannasch beschriebenen Glykogenspeicherzellen und korrelieren mit Ausfallsbezirken des leberspezifischen Antigens (Weiler, Börner, 1968). Weitere Enzymverluste von Nukleosid-5-Triphosphatasen (Schauer & Kunze, 1968; Börner & Goessner,1968) korrelieren zwar mit dem Auftreten von G-6-Pase-Defekten, doch können solche Enzymdefekte in verschiedenen Kombinationen oder einzeln auftreten (Schieferstein, 1974). Dies entspricht den Verhältnissen bei Tumoren (Friedrich-Freksa et al., 1969). Während also enzymfreie Areale und Tumoren durchaus unterschiedliche Kombinationen von Enzymdefekten haben können, weist jedoch die homogene Verteilung des Enzymdefektmusters

innerhalb eines enzymfreien Areals oder eines Tumors auf eine monoklonale Entstehung hin. Mit ^{3}H-Thymidin durchgeführte zellkinetische Untersuchungen von Scherer & Hoffmann stützen diese Annahme. Die unterschiedliche Verteilung einzelner Enzymdefekte in verschiedenen enzymfreien Arealen spricht gegen eine kausale Bedeutung der Aktivitätsverluste für die Tumorbildung. Man kann jedoch davon ausgehen, daß die Zahl der Enzymausfälle mit der Zahl der Treffer korreliert und damit ein quantitatives Maß für die Wahrscheinlichkeit des gleichzeitigen Ausfalls wachstumsregulatorischer Funktionen sind. Durch quantitative Auswertung von Anzahl, Größe und Gesamtfläche solcher enzymfreier Areale sollten in der vorliegenden Arbeit sämtliche Aspekte der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen der DÄNA-Carcinogenese einschließlich ihrer Beeinflussung durch die Cytochrom P 450-Funktion untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material und Versuchstiere

2.1.1 Chemikalien

DÄNA	Merck-Schuchardt Code Nr. I 194, Mol.Gew. 102,14
Phenobarbital-Na	Merck AG,Darmstadt
Halothan	Fluothan^{R}, ICI GmbH
SKF 525 A	Fa. Röhm & Haas, Darmstadt
Methylcholanthren	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Metyrapon	Ciba AG, Basel
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	Merck AG, Darmstadt
Glucose-6-Phosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Entellan^{R}	Merck AG, Darmstadt
NADH, NADP aus Pferdeherz	Boehringer,Mannheim
Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz	Boehringer, Mannheim
DL-Isocitronensäure Na_3 Salz x 2 H_2O	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
4-Nitroanisol	Merck AG, Darmstadt
Folin-Ciocaltens Phenolreagenz	Merck AG, Darmstadt
^{14}C-DMNA	hergestellt durch Nitrosierung von ^{14}C-DMA nach einer Vorschrift von Dutton & Heath (1956) am Inst. f. Toxikologie und Chemotherapie, am DKFZ Heidelberg
Albumin	Fa. Calbiochem., Los Angeles, USA

2.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Versuchstiere waren weibliche Wistarratten der Fa. Ivanovas aus Kisslegg/Allgäu. Sie wurden bei künstlichem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und erhielten Altromin-Standardfutter der Fa. Altrogge, Brackwede, sowie Wasser ad libitum. Nach mindestens 8-tägiger Eingewöhnungszeit an die Stallbedingungen wogen sie bei Versuchsbeginn 120 $\pm$ 20g.

2.2 Methoden der in vivo Versuche

2.2.1 Vorbehandlung der Tiere

DÄNA: In Abhängigkeit von Behandlungsdauer und Versuchsziel wurden drei verschiedene Applikationsarten gewählt: bei kurzdauernden Applikationszeiten von maximal 5 Tagen wurde DÄNA in einer Dosierung von 10 mg/kg KG in 0,9%iger bzw. 20 mg/kg KG in 0,4%iger NaCl-Lösung und einer Injektionsmenge von 0,5 ml/100 g KG intraperitoneal verabreicht. Bei längeren Versuchszeiten von 2-6 Wochen wurde DÄNA in Dosierungen von 2-10mg/kg KG pro Tier per Schlundsonde appliziert. Sondiert wurden jeweils 5 ml/kg KG des in Leitungswasser gelösten DÄNA. Langzeitversuche von mehr als 7 Wochen machten eine Anwendung von DÄNA im Trinkwasser erforderlich. Dosierungen waren 0,1-5 mg/kg KG. Voraussetzung für eine exakte Einstellung der Dosierung war eine wöchentliche Kontrolle von Körpergewicht und Trinkmenge.

Phenobarbital: wurde jeweils eine Woche vor und während der DÄNA-Behandlung als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser angeboten. Dies entspricht einer täglichen Dosis von ca. 50-100 mg/kg KG.

3-Methylcholanthren: wurde zweimal wöchentlich in einer Dosis von 50 mg/kg KG in Olivenöl gelöst, 1 h vor DÄNA intraperitoneal gespritzt.

SKF 525 A: wurde in einer Dosierung von 100 mg/kg KG und einer Injektionsmenge von 5 ml/kg KG in physiologischer NaCl-Lösung 1 h vor der DÄNA-Applikation intraperitoneal gespritzt.

Metyrapon: die Versuchstiere bekamen 50 mg/kg KG in Leitungswasser gelöst 1 h vor DÄNA per Schlundsonde.

Kobaltchlorid: eine Dosis von 40 mg/kg KG wurde in einer Lösung von 1,6 g $CoCl_2$/100 ml 0,3%iger NaCl-Lösung, entsprechend einer 300 mosmol NaCl-Lösung,dreimal im Abstand von 2 Tagen unter die Rückenhaut gespritzt. Dieselbe Dosis war bei intraperitonealer Injektion letal.

2.2.2 Aufbereitung der Leber

Zur besseren Darstellbarkeit der zu untersuchenden Enzyme wurden die Tiere 12 h vor der Leberentnahme nüchtern gehalten. Die Tötung erfolgte nach vorheriger Gewichtsbestimmung durch Dekapitation. Zur besseren Beurteilung der Schnitte wurden die Tiere gründlich ausgeblutet, die Leber entnommen, deren Gesamtgewicht bestimmt, anschließend jeweils der große Leberlappen aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit für die histochemische Enzymbestimmung verwendet und auf Kryostattischchen nach Dittes mit CO_2 eingefroren. In einem Kryostaten nach Dittes-Duspiva wurden von jedem Leberlappen drei 10µ-dicke Schnitte in verschiedenen Ebenen angefertigt,

auf einen vorgekühlten Objektträger mit dem Finger angetaut und mit einem auf kalt eingestellten Fön getrocknet.

2.2.3 Nachweis der Adenosintriphosphatase und der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität

Für die Darstellung der ATPase- und G-6-Pase-Aktivität in den so behandelten Schnitten fand die Bleisalzmethode nach Wachstein & Meisel (1956, 1957) Anwendung. Sie beruht auf dem indirekten Nachweis von Phosphat, welches enzymatisch von ATP bzw. G-6-P abgespalten wird. Die Enzyme arbeiten bei einem pH-Optimum von 7,2 bzw. 6,7 und benötigen Mg-Ionen zur Aktivierung. Phosphat läßt sich mit Bleiionen als weißes Pyromorphit $Pb_5 (PO_4)_3 Cl$ (Pratt, 1954) ausfällen. Dieses wird durch Umfällung mit Ammoniumsulfid in das schwarze, gut sichtbare und unlösliche Bleisulfid übergeführt.

Inkubationslösung für den Nachweis der ATPase Aktivität:

- 100 ml 0,2 M Trismaleatpuffer pH 7,2 (mit 1 N NaOH eingestellt)
- 110 ml Aqua dest.
- 17 ml 2%iges Bleinitrat
- 25 ml 0,1 M Magnesiumsulfat
- 125mg Adenosin-5-Triphosphat

Die Lösung wird 15 Min. an der Wasserstrahlpumpe entlüftet und auf 37° C temperiert.

Inkubationslösung für den Nachweis der G-6-Pase Aktivität

- 100 ml Trismaleatpuffer pH 6,7, 0,2 M
- 135 ml Aqua dest.
- 15 ml 2%iges Bleinitrat

- 125 mg Glucose-6-Phosphat

Die Lösung wird ebenfalls 15 Min. an der Wasserstrahlpumpe entlüftet und auf 37° C temperiert.

- Vorfixieren in 0,5%igem Glutaraldehyd	5 sec.
- Wässern in fließendem Wasser	1 min.
- Inkubation bei 37° C (Lösungen s.o.)	50-60 min.
- Spülen in Leitungswasser	5 sec.
- Fällung in 0,75%igem Ammoniumsulfid (bis Braunfärbung des Schnittes)	ca. 1-1,5 min.
- Spülen in Leitungswasser	5 sec.
- Fixieren in 5%igem Glutaraldehyd mit Zusatz von 5% Eisessig	15 min.
- Wässern in fließendem Wasser	5 min.
- Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun	3-5 min.
- Bläuen in fließendem Wasser	15 min.
- Alkoholreihe 30%, 50%, 70%, 3 x 100%	je 1 min.
- 2 x Xylol	je 2 min.
- Eindecken in Entellan^{R}	

2.2.4 Meßmethode

Die Auswertung der Areale erfolgte an der 160-fach vergrößerten Projektion des Präparats auf eine Integrationsmattscheibe. Hierzu eignet sich die Integrationsplatte II 100/25 von Zeiss. Sie ist als Strichplatte konstruiert, auf welcher ein quadratisches Gesichtsfeld mit 100 gleichmäßig verteilten Strichmarkierungen aufgezeichnet ist.

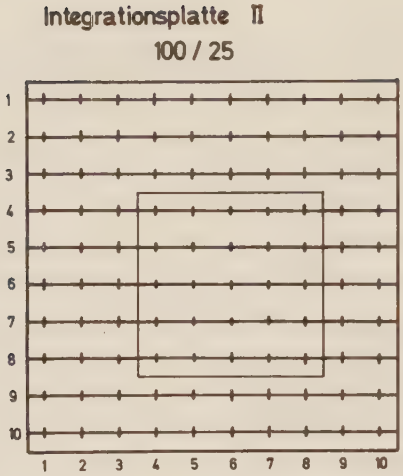


Abb. 2 : Zeiss Integrationsplatte II 100/25 .

Nach der Eichung mittels eines Objektmikrometers entspricht der Strichabstand auf der Projektionsplatte einer Strecke von 60 µm auf dem Präparat. Daraus errechnet sich die Seitenlänge des Gesichtsfeldes von 0,6 mm. Ein Meßfeld entspricht also einer Fläche von 0,36 mm^2 auf dem Präparat. Bei der meanderförmigen, lückenlosen und vollständigen Ausmessung des Präparats durch jeweiliges Weiterschieben um 0,6 mm wurden mit einem manuellen Zählgerät einmal die Zahl der Meßfelder (Z), dann die Anzahl der darin sich befindenden Inseln (I) und alle auf Inseln fallende Strichmarkierungen (S) gezählt. Aus dem Quotienten I/Z errechnet sich dann die durchschnittliche Anzahl von Inseln pro Meßfeld, S/Z ergibt den prozentualen Anteil von Inselgewebe am Gesamtgewebe und S/I entspricht der mittleren Einzelinselgröße. Durch Umrechnen der auf ein Meßfeld von 0,36 mm^2 bezogenen Größen

erhält man die absoluten Werte in mm^2 bzw. cm^2.
Die Verteilung der Inseln in einem Präparat und im Zusammenhang damit die Frage,wieviele Meßfelder (Z) zur ausreichenden Beurteilung von Gesamtinselfläche (S/Z) und mittleren Inselzahl/Meßfeld (I/Z) benötigt werden,sollte anhand des Schnittpräparates eines mit 180 mg/kg KG DÄNA 5 Wochen lang behandelten Tieres untersucht werden.Dazu wurden 10, 20, 50 und 100 Gesichtsfelder je 20 mal ausgezählt und die Verteilung der Werte für Inselzahl und Inselfläche in Häufigkeitskurven und Summenkurven graphisch dargestellt (Abb.3, 3a, 4 und 4a).

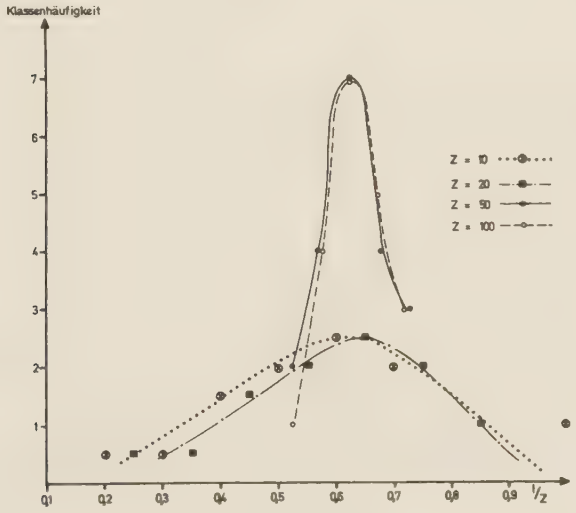


Abb. 3 : Verteilung der mittleren Inselzahl/Meßfeld bei Auszählung von 10, 20, 50 und 100 Meßfeldern.

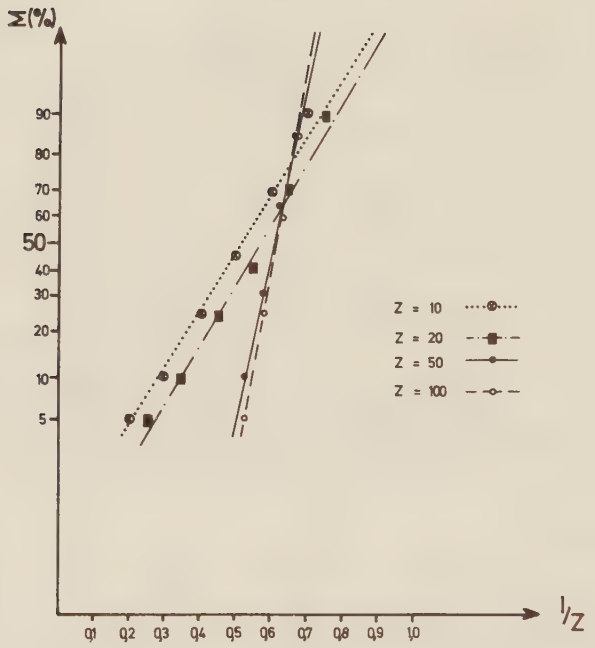


Abb. 3a : Verteilung von I/Z in Summenkurven (vgl.Abb.3)

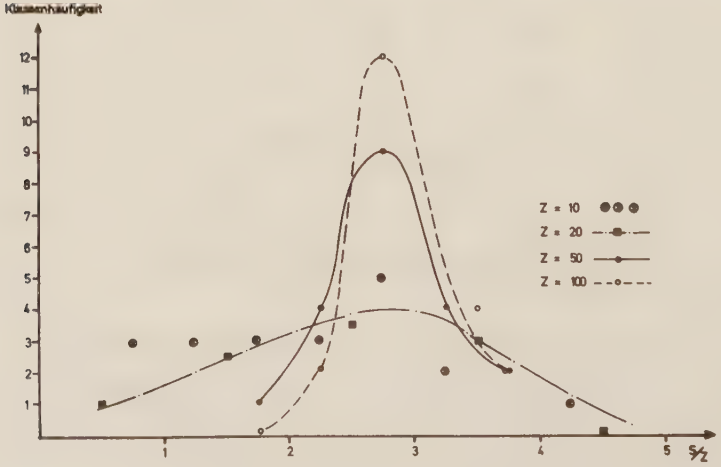


Abb. 4 : Verteilung der Gesamtinselfläche/Meßfeld bei Auszählung von 10,20,50 und 100 Meßfeldern .

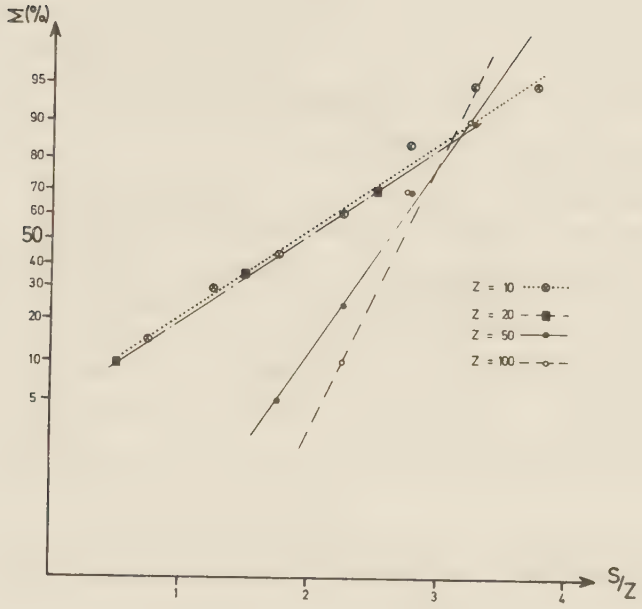


Abb. 4a : Verteilung von S/Z in Summenkurven (siehe Abb.4)

Bei Auszählung einer geringen Zahl von Meßfeldern ergab sich ein flacher Verlauf der Summenkurven und damit eine relativ große Standardabweichung. Durch Vergrößerung der Meßfeldzahl wurde eine zunehmende Steigung der Summenkurven erzielt.
In dem untersuchten Präparat wurde der Mittelwert bei Auszählung von 50 Meßfeldern mit hinreichender Genauigkeit erfaßt und durch Verdoppelung der Meßfeldzahl nicht weiter präzisiert.
Da das Ausmaß der Streuung auch von der Inselhäufigkeit und somit von der Dosierung abhängt,besitzen

diese Werte keine Allgemeingültigkeit für sämtliche Präparate. Deshalb wurden die hier als ausreichend gefundenen Zahlen überschritten und jeweils das ganze, etwa 200-300 Meßfelder umfassende Präparat ausgezählt.

Z	Inselzahl I/Meßfeld Z		Trefferzahl S/Meßfeld Z	
	Mittelwert	Standard-weichung	Mittelwert	Standardabweichung
10	0,575	0,1997	2,06	0,9659
20	0,6375	0,1555	2,545	0,8794
50	0,6227	0,0608	2,818	0,4603
100	0,6445	0,0603	2,916	0,4044

Tab. 1: Mittelwerte und Standardabweichungen in Abhängigkeit von der Anzahl ausgewerteter Meßfelder Z.

2.2.5 Glucose-6-Phosphatase Bestimmung im Homogenat

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde im Leberhomogenat nach Harper (1962) durch Bestimmung des abgespalteten Phosphats nach Fiske & Subbarow gemessen.

Lösungen:

1) Citratpuffer (0,1 M pH 6,5)

2,101 g Citronensäure ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) in 50-75 ml aqua dest. lösen. pH-Wert mit 30%iger NaOH auf 6,5 einstellen, mit aqua dest auf 100 ml auffüllen.

2) Glucose-6-Phosphat (0,08 M G-6-P)

417 mg G-6-P-Ba Salz x 7 H_2O in 2-3 ml aqua dest. suspendieren.

Soviel 1 N HCl zufügen, bis sich das Salz eben löst. 114 mg Na_2SO_4 zugeben. Mischen, zentrifugieren, Ba_2SO_4-Niederschlag verwerfen. Zum Überstand vorsichtig einen Tropfen Na_2SO_4-Lösung zugeben, wobei sich kein Niederschlag bilden darf. pH Wert mit 30%iger NaOH auf 6,5 einstellen und mit aqua dest. auf 10 ml auffüllen.

3) Ammoniummolybdat (2×10^{-3} M)
2,5 g $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$ in 500 ml aqua dest. lösen. 14 ml konz. H_2SO_4 vorsichtig zu 200 ml aqua dest. geben. Verdünnte Säure in die Molybdatlösung gießen und mit aqua dest. ad 1000 ml auffüllen.

4) Reduktionslösung (ca. $4{,}2 \times 10^{-2}$ M 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure; ca. 0,56 M SO_3^{2-})
5,7 g $NaHSO_3$ + 0,2 Na_2SO_3 in 50 ml aqua dest. lösen. 0,1 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure darin auflösen, mit aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

5) Phosphat-Standardlösung (5×10^{-4} M)
68 mg KH_2PO_4 in aqua dest. lösen, 10 ml konz. H_2SO_4 zugeben, mit aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Versuchsansatz und Analysengang:

Das Gewebe wurde nach der Gewichtsbestimmung in 0,1 M Citratpuffer bei 4° C im Verhältnis Gewebe:Puffer = 1:9 mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert.

Inkubationsansatz I: 0,5 ml Homogenat (= 50 mg Leber)
+0,5 ml 0,08 M G-6-P-Lösung

Leerwert L: 0,1 ml Citratpuffer
+0,1 ml 0,08 M G-6-P-Lösung

Kontrollansatz K: 0,1 ml Homogenat
+0,1 ml Citratpuffer

Phosphatstandard S: 0,5 mM Phosphatlösung

Nach 5, 10 und 15 Min. Inkubation bei 37° C wurden 0,2 ml von Inkubat, Leer-und Kontrollansatz in 2 ml vorgelegter 10%iger Trichloressigsäure zur Eiweißfällung gegeben und anschließend 15 Min. zentrifugiert. Der Phosphatgehalt wurde kolorimetrisch bei 700 nm bestimmt.

Phosphatstandard: 1,0 ml Phosphatlösung 0,5 mM
+5 ml Ammoniummolybdatlösung 2 mM

Proben: 1,0 ml Überstand
+5 ml Ammoniummolybdatlösung 2 mM

Zugabe von 1,0 ml Reduktionslösung, Messung der Extinktion E bei 700 nm nach 30 Min., wobei die Zeit zwischen Einmischen und Messen konstant gehalten werden muß. Die Enzymaktivität in U/g Leber errechnet sich aus:

$$\frac{E_I - E_K}{E_S} \times \frac{0{,}5 \times 2{,}2 \times 1000}{t \times 10} = \frac{\mu\text{Mol Phosphat}}{\text{min.} \times \text{g Leber}}$$

E_I = Extinktion der Lösung des Inkubationsansatzes

E_K = Extinktion der Lösung des Kontrollansatzes

E_S = Extinktion des Standardansatzes

0,5 = µMol Phosphat im Standardansatz

2,2 = Volumen des Ansatzes zur enzymatischen Reaktion nach Zugabe von TCA (ml)

t = Laufzeit der enzymatischen Reaktion (Min.)

10 = mg Gewebe in 0,2 ml Ansatz zur enzymatischen Reaktion

1000 = Umrechnungsfaktor von mg auf g

2.3 Methoden der in vitro Versuche

2.3.1 Mikrosomenpräparation

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, ausgeblutet, die Leber herauspräpariert, gewogen und in eiskalter 0,25 M Saccharose-Lösung (die 5,5 mM EDTA und 0,02 M Tris enthält) bei pH 7,5 gruppenweise zu gleichen Gewichtsanteilen gepoolt, mit der Schere zerkleinert und im Verhältnis Gewebe:Puffer = 1:4 mit einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Die Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien wurden bei 500, 7000 und 9500 Upm je 10 Min. (HB4-Rotor, Sorvall Zentrifuge), der verbleibende Überstand anschließend 60 Min. bei 40 000 Upm entsprechend 105 000 g zentrifugiert. Die sedimentierten Mikrosomen wurden in Tris/KCl-Pufferlösung (1 Teil 0,25 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 + 4 Teile 0,15 M KCl) resuspendiert und nochmals 60 Min. bei 40 000 Upm zentrifugiert. Schließlich wurde das Mikrosomenpellet in 10 ml Tris/KCl-Puffer aufgenommen.

2.3.2 Bestimmung des mikrosomalen Proteins nach Lowry

Lösungen:

1) Alkalisches Kupferreagenz:

0,5 ml 1%ige Kupfersulfat-Lösung ($CuSO_4 \times 5\ H_2O$)
+ 0,5 ml 2,7%ige Kalium-Natriumtartrat-Lösung
+ 50 ml 2%ige Na_2CO_3-Lösung

2) Folin-Ciocaltens-Phenolreagenz:

1:1,36 mit aqua dest. verdünnt.

Ansatz: 0,2 ml Mikrosomensuspension (1:50 verdünnt)
+ 0,8 ml aqua dest.
+ 4,0 ml alkalisches Kupferreagenz (s.o.)

10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen

+ 0,5 ml Folin-Ciocaltens-Reagenz (s.o.)

gut mischen und nach 30 Minuten bei einer Extinktion von 720 nm messen.

Standardlösung ist eine 1 mg/ml Rinder-Serum-Albumin-Lösung.

2.3.3 Messung der Cytochrome b 5 und P 450 (nach Omura & Sato, 1961)

Cytochrom b 5:

	Meßküvette	Kontrollküvette
Mikrosomensuspension	0,5 ml	0,5 ml
KCl/Tris Puffer (4:1)	2,5 ml	2,5 ml
NADH (20 mg/ml KCl/Tris Puffer)	10 ul	-

Cytochrom P 450:

	Meßküvette	Kontrollküvette
Mikrosomensuspension	0,5 ml	0,5 ml
KCl/Tris Puffer	2,5 ml	2,5 ml
mit CO 20'' lang durchperlen	CO	-
einige Körnchen	$Na_2S_2O_4$	$Na_2S_2O_4$

Die Cytochromgehalte wurden unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten von Omura & Sato, der Gehalt an Cytochrom b 5 mit Korrektur für die verwandten Wellenlängen errechnet. Beide Meßansätze wurden zwischen 500 und 400 nm im Spektralphotometer gemessen, wobei für Cytochrom P 450

die Extinktionsdifferenz E zwischen 450 und 490 nm, für Cytochrom b 5 E zwischen 420 und 450 nm abgelesen wurde. Nach Umrechnung auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml entspricht eine Extinktion von 0,1 = 1,1 nmol P 450/mg Protein bzw. 0,953 nmol b 5/mg Protein.

2.3.4 Nitroanisol-Demethylierung

NADPH-regenerierendes System:

70,5 mg Isocitrat-Natrium
+ 23,7 mg NADP-Natrium
+ 120 µl Isocitrat-Dehydrogenase
+ 3 ml KCl/Tris Puffer (siehe 2.3.1)

Ansatz:
0,5 ml NADPH-regenerierendes System
0,5 ml Mikrosomensuspension (10 mg Protein/ml)
0,5 ml Nitroanisol-Lösung (15,3 mg Nitroanisol/100 ml KCl/Tris Puffer)
1,0 ml KCl/Tris Puffer (siehe 2.3.1)

Gemessen wird bei 405 nm im Eppendorf-Photometer, die Kinetik mit dem Eppendorf-Kompensationsschreiber registriert. Der Start erfolgte durch Zugabe von Nitroanisol. Die Eichkurve wird durch Zugabe von 0,05 ml einer 0,5 nM p-Nitrophenol-Lösung, dem gelben Endprodukt der Reaktion, zu einer nicht gestarteten Testlösung erstellt.

2.3.5 DMNA-Demethylierung

Inkubationsansatz: 0,5 ml NADPH-regenerierendes System (siehe 2.3.4)

1 ml Mikrosomensuspension (10 mg Protein/ml)
0,5 ml KCl/Tris-Puffer (siehe 2.3.1)
0,5 ml DMNA (675 mM)

Gestartet wurde mit DMNA. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C im Schüttelbad wurden 1 ml des Inkubats mit 1 ml 7,5%iger TCA gefällt und zentrifugiert. Der Nachweis von Formaldehyd erfolgte nach der Methode von Nash. Dazu wurden 1,5 ml des TCA-Überstandes mit 1,5 ml des Nash-Reagenz (siehe unten) versetzt, 12 Minuten bei 58° C im Wasserbad inkubiert und nach Abkühlen die Extinktion E bei 412 nm gemessen. Dabei entspricht E = 0,1 49,3 nM Formaldehyd/ml Inkubationslösung. Der Umsatz wird in nM/mg Protein x Min. angegeben.

Nash-Reagenz enthält in 1000 ml:

150 g Ammoniumacetat
2 ml Acetylaceton
3 ml konz. Essigsäure

auf pH 6,0 eingestellt.

2.3.6 Alkylierung von Proteinen

Inkubationsansatz: 0,5 ml NADPH-regenerierendes System (siehe 2.3.4)
1 ml Mikrosomensuspension (10 mg Protein/ml)
1 ml KCl/Tris-Puffer (siehe 2.3.1)
0,05 ml ^{14}C-DMNA (1 mg/ml, 100 µCi/ml)

Inkubationszeit 60 Minuten bei 37° C im Schüttelbad. Zugabe von 2,5 ml 5%iger TCA, 5 Min. Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, 5000 Upm). Der Überstand wurde verworfen.

Proteinwaschung: Sediment + ca. 10 ml 2,5%ige TCA.10 Min. schütteln, zentrifugieren (Sorvall-Zentrifuge bei 5000 Upm), Überstand verwerfen.
+ 10 ml H_2O 10 Min. schütteln, zentrifugieren, Überstand verwerfen.
+ 10 ml H_2O 5 Min. schütteln, zentrifugieren (10 Min.), Überstand verwerfen.
+ 10 ml C_2H_5OH (absolut) bei 90° C 10 Min. schütteln, zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
+ 10 ml $CHCl_3/CH_3OH$ im Verhältnis 1:1. 10 Min. schütteln, zentrifugieren, Überstand verwerfen.
+ 10 ml C_2H_5OH/Diäthyläther im Verhältnis 1:1.10 Min. schütteln, zentrifugieren, Überstand verwerfen.
+ 10 ml Diäthyläther 10 Min. schütteln, zentrifugieren, den Überstand verwerfen.

Das Sediment wird unter dem Abzug getrocknet, in 1,5 ml 1N NaOH aufgelöst und mit HCl neutralisiert. Davon werden 0,05 ml für die Proteinbestimmung nach Lowry benötigt, von 1,0 ml Proteinlösung in 10 ml der Xylol/Triton-Scintillationslösung werden die dpm-Werte bestimmt (Anderson, McClure, 1973). Die Radioaktivitätsmessung erfolgt im Liquid Scintillation Counter der Fa. Berthold & Friesecke mit angeschlossenem Diehl-Algotronik-Rechner.

2.4. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte und ihrer Streuung, sowie durch Signifikanzprüfung zweier Vergleichsreihen nach der t-Verteilung von Student und Ermittlung der Wahrscheinlichkeitsgrenzen aus den Geigi-Tabellen. Als statistisch gesichert galten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,01$.

Für die Abhängigkeit der Gesamtinselflächen (y) von der Zeit der DÄNA-Applikation, d.h. der DÄNA-Gesamtdosis im Durchfütterungsversuch (x) wurden nach logarithmischer Transformation beider Koordinaten die linearen Regressionen und das Konfidenzintervall für das Signifikanzniveau $a=0,05$ berechnet. Jedem Tier entsprach dabei ein Punkt, der aus drei in verschiedenen Schnittebenen derselben Leber gemessenen Werten gemittelt worden war. Für alle Versuchsgruppen mit kontinuierlicher DÄNA-Applikation wurde die Annahme geprüft, daß alle Anstiegswinkel der Regressionsgeraden einen gemeinsamen wahren Wert haben. Der Schätzwert für den gemeinsamen Regressionskoeffizienten und das 95% Konfidenzintervall hierzu wurden ermittelt (Daten im tabellarischen Anhang) In gleicher Weise wurden die Linearität der Regression und die Regressionskoeffizienten für das autonome Inselwachstum nach Unterbrechen der Carcinogenzufuhr ermittelt. Berücksichtigt wurden dabei nur Meßwerte, die nach mehr als sechswöchiger behandlungsfreier Zeit gewonnen worden waren. (S. 88 und folgende).

3. ERGEBNISSE

3.1 Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen der DÄNA-Carcinogenese

Mit dem Tumortastbefund bzw. Tumortod als Parameter carcinogener Wirkung können lediglich die Entstehung von Spätwirkungen und Endergebnisse der Carcinogenese erfaßt werden. Subjektive und damit ungenaue Bewertbarkeit der Tumorgröße und -beschaffenheit, relativ lange Versuchszeiten, welche für die Entwicklung der Tumoren erforderlich sind, lassen eine Testung potentiell carcinogener Substanzen durch die makroskopische und histologische Beurteilung nur beschränkt zu. Zudem müssen, bedingt durch die begrenzte Überlebenszeit der Versuchstiere von nur wenigen Jahren, subtoxische Dosen schwächerer Carcinogene mit erheblichen Sekundärwirkungen eingesetzt werden, um überhaupt Tumore nachweisen zu können, was eine Übertragung der Ergebnisse auf menschliche Verhältnisse außerordentlich erschwert. Ein solches Vorgehen steht im Widerspruch zu der Forderung der arbeitstechnischen und zeitlichen Rentabilität, die an jedes Testsystem gestellt werden muß. Die Bestimmung der einleitend beschriebenen Enzymausfälle, welche unter Einwirkung des Carcinogens entstehen, scheint diesen Forderungen nachzukommen.

3.1.1 Möglichkeiten einer frühzeitigen und kontinuierlichen Erfassung von Frühstadien des Tumorgeschehens

Aus Gründen der methodischen Einfachheit wurde zunächst das Homogenat aus Lebern vorbehandelter Tiere auf eine Verminderung

der G-6-Pase geprüft. Hierzu wurde den Tieren täglich 5 mg/kg DÄNA per Schlundsonde zugeführt, wobei eine Gruppe (DPh) während der gesamten DÄNA-Applikationszeit mit 0,1%iger Phenobarbital-Trinkwasser-Lösung induziert wurde. Nach 2, 3, 4, 5 und 6 Wochen wurde bei je 3 Tieren beider Gruppen die Behandlung eingestellt. Um reversible toxische Aktivitätsveränderungen zu vermeiden, wurde bis zur Enzymbestimmung ein behandlungsfreies Intervall von 5 Wochen eingehalten. Von je 3 Tieren einer gleichaltrigen Kontrollgruppe Ko, der Gruppe D und DPh wurden die G-6-Pase-Gehalte einzeln nach 2, 3, 4, 5 und 6-wöchiger Behandlung bestimmt.

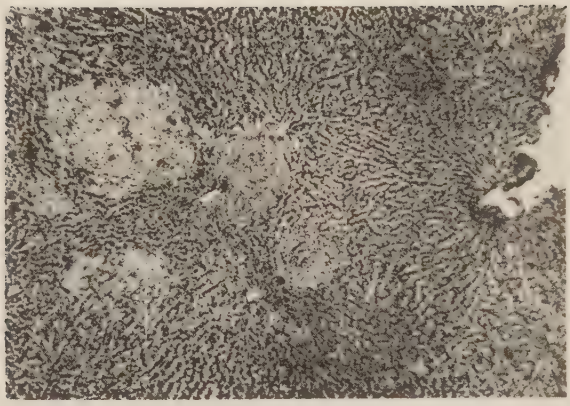
	2 Wochen	3 Wochen	4 Wochen	5 Wochen	6 Wochen
Ko	16,9±1,6	15,4±0,7	18,1±0,7	17,0±1,4	16,3±1,1
D	13,3±0,9	14,5±1	17,3±1	14,2±1,5	15,9±0,9
DPh	15,8±0,6	14,2±1,5	17,0±0,5	13,2±1,3	14,0±1

Tab. 2: Mittelwerte der G-6-Pase Gehalte in Units/g Leber (verwendet wurden die 10 Min-Werte einer 30 Min-Enzymkinetik).

Nach Tab. 2 liegen zwar sämtliche G-6-Pase Gehalte der DÄNA vorbehandelten Gruppen D unter der Kontrolle Ko, doch kann keine kontinuierliche Abnahme mit zunehmender Behandlungszeit beobachtet werden, da sämtliche Werte im Streubereich liegen. Somit erweist sich die Bestimmung des G-6-Pase Gehaltes im Homogenat für die Erfassung von Frühveränderungen der Carcinomentstehung als ungeeignet. Dies zeigten auch Unter-

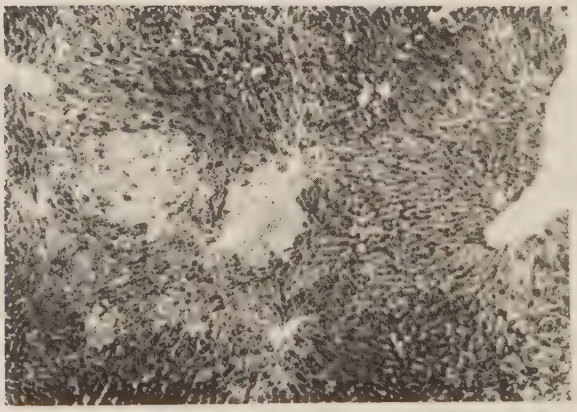
suchungen der Aktivitätsgehalte anderer Enzyme im Gesamthomogenat. Da es sich bei der Tumorentstehung und den damit verbundenen Enzymdefekten nicht um diffus-toxische, sondern um umschriebene Ausfälle handelt, lassen sich diese jedoch histochemisch im erhaltenen Zellverband lokalisieren. Mit G-6-Phosphat oder ATP als Substrate können an Gefrierschnitten G-6-Pase bzw. ATPase-Defekte mit derselben Methode nachgewiesen werden. Beide Ausfälle korrelieren statistisch mit der Carcinogenese, sind also nicht kausal für die Wachstumsbeschleunigung notwendig. Sie können deshalb einzeln oder kombiniert auftreten. Beim getrennten Nachweis einer G-6-Pase und ATPase Aktivität in Parallelschnitten können Areale, in denen beide Enzyme fehlen, zur Deckung gebracht werden. Daraus kann gefolgert werden, daß die enzymdefekten Zellareale monoklonal entstanden sind. (siehe Abb.5a und 5b)Zur Beurteilung von Enzymverlusten als Parameter für die Wirksamkeit hepatocarcinogener Substanzen genügt die quantitative Aktivitätsbestimmung eines Enzyms. Gegenüber der ungleich verteilten G-6-Pase Aktivität im normalen Leberläppchen mit zentral geringerer Aktivität, zeigt die ATPase eine homogene Verteilung, was für die Auszählung der Defekte wegen der besseren Erkennbarkeit kleiner zentral gelegener enzymfreier Areale von Vorteil ist (siehe Abb. 5a und 5b).

Mit dieser Methode kann die Entwicklung der Enzymdefekte von der Einzelzelle bis zum makroskopisch sichtbaren enzymfreien Areal verfolgt werden (siehe Abb.6a - 6d).



5 a

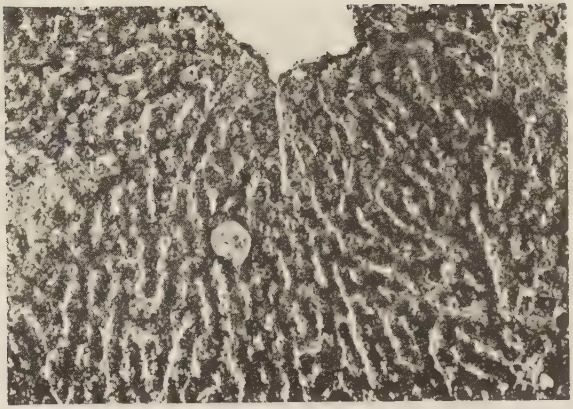
200 µm



5 b

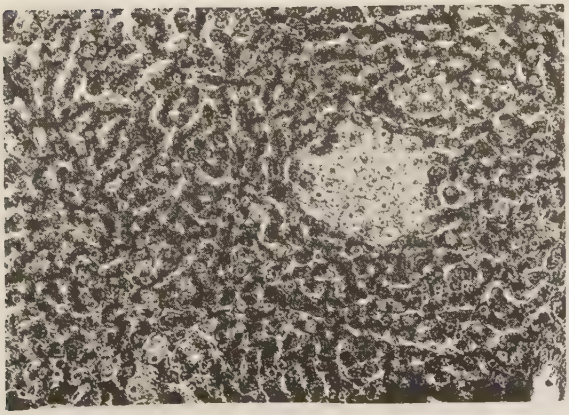
200 µm

Abb. 5a und 5b: Nachweis deckungsgleicher ATPase-freier (5a) und G-6-Pase-freier (5b) Areale in Parallelschnitten. (Tier D_3^4, siehe Tab.3, Organ: Leber).



6 a

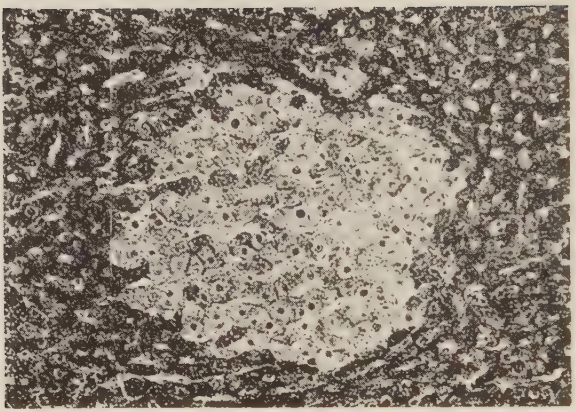
200 µm



6 b

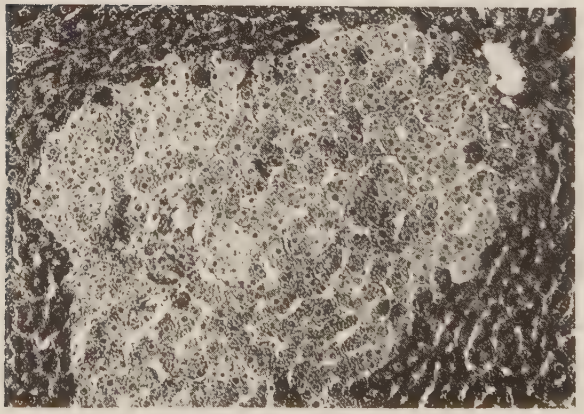
200 µm

Abb. 6a-6d: Entwicklung ATPase-freier Areale von der Einzelzelle bis zum makroskopisch sichtbaren enzymfreien Areal. (Tier $D_1 5$, siehe Tab.3, Organ:Leber).



6 c

200 µm



6 d

200 µm

Meßgrößen der vorliegenden Untersuchungen waren die Gesamtinselfläche F, Inselzahl pro cm^2 I und die mittlere Fläche der enzymfreien Areale M in $mm^2 x 10^{-2}$. Geht man von der Annahme aus, daß ein enzymfreies Areal aus einer transformierten Zelle entsteht und vernachlässigt man Phänomene wie z.B. Verminderung der Zahl enzymfreier Areale durch immunologische Reaktionen und Konfluieren von Arealen, so ist die Zahl der enzymfreien Areale pro cm^2 ein direkter Parameter der carcinogenen Substanzwirkung. Unter der Annahme einer monoklonalen Entstehung ist die Vergrößerung des enzymfreien Areals ein Parameter der Zellvermehrung und damit der Zeit. Bei der angewandten Methode ist die mittlere Fläche M, die sich aus dem Quotienten von Gesamtfläche F und der Zahl pro cm^2 I enzymfreier Areale errechnet, schwieriger zu deuten. Unter Durchfütterungsbedingungen gehen einmal das zeitabhängige Wachstum älterer enzymfreier Areale, zum andern frisch induzierte Areale in die Meßgröße ein. Sie besitzt deshalb die größte Streuung .Die Gesamtfläche F wird als prozentualer Anteil enzymfreier Areale bezogen auf das Gesamtgewebe angegeben. Sie ist das Produkt aus Zahl I und mittlerer Fläche M der enzymfreien Areale und repräsentiert deshalb sowohl die Wirkung der Dosis der carcinogenen Substanz als auch die der Zeit sowie aller weiteren, den Cancerisierungsverlauf beeinflußenden Faktoren. Als geeignetster Parameter dient die Gesamtfläche der enzymfreien Areale F zur quantitativen Beurteilung des präcancerösen Stadiums.

3.1.2 Zeit-Wirkungs-Beziehungen bei kontinuierlicher DÄNA-Applikation

Wie unter 2.2.1 beschrieben wurde den Versuchstieren 5 mg/kg KG DÄNA pro Tag per Schlundsonde appliziert. Sondiert wurde an 6 Tagen in der Woche. Die Tiere wurden wie im Versuch 3.1.1 in Gruppen zu je 3 Ratten nach 2, 3, 4, 5 und 6 Wochen mit DÄNA-Gesamtdosen von 60, 90, 120, 150 und 180 mg/kg KG abgesetzt. Aus den beschriebenen Gründen wurde eine Wartezeit von 5 Wochen zwischen Absetzen des Carcinogens und dem Tötungstermin gewählt. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten in den Lebern gleichaltriger Kontrolltiere zu keiner Zeit enzymfreie Inseln gefunden werden, während bei den behandelten Gruppen die oben definierten Meßgrößen Gesamtinselfläche F, Inselzahl/cm^2 I und die mittlere Einzelinselfläche M einen linearen Anstieg im doppelt logarithmischen System zeigten (s. Abb. 7 und Tab. 3).

Dabei weist die Zeit-Wirkungs-Beziehung der Gesamtinselfläche F mit einem Anstiegswinkel von 78,5° entsprechend einer Steigung von 4,9 (tan 78,5° = 4,9) die größte Anstiegssteilheit auf. Der Zeit-Wirkungsverlauf von Inselzahl/cm^2 I hat mit 72° eine Steigung von 3,1. Die mittlere Inselfläche M steigt mit einem Winkel von 61° entsprechend der Steigung 1,8 an.

Mathematisch stellen sich die Zeit-Wirkungs-Beziehungen nach der allgemeinen Geradengleichung y = ax + b wie folgt dar:

Gleichung 1 $\quad \lg F = 4{,}9 \lg t + \lg K_f$

oder $\quad F = t^{4{,}9} \times K_f$

Gleichung 2 $\quad \lg I = 3{,}1 \lg t + \lg K_i$

oder $\quad I = t^{3{,}1} \times K_i$

Gleichung 3 $\quad \lg M = 1{,}8 \lg t + \lg K_m$

oder $\quad M = t^{1{,}8} \times K_m$

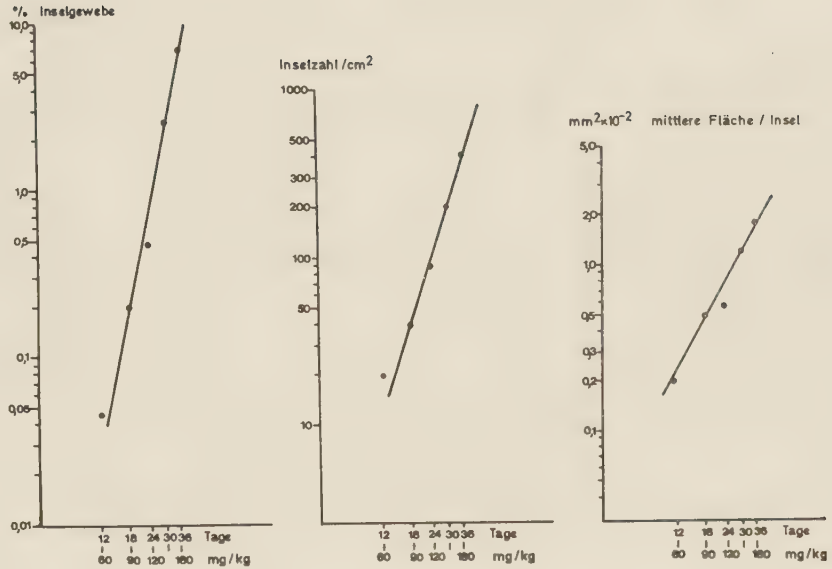


Abb. 7 : Durchfütterung mit 5 mg/kg KG DÄNA pro Tag über 2 - 6 Wochen mit DÄNA Gesamtdosen von 60 - 180 mg/kg KG . Die Linearität der Regressionen wurde maschinell ermittelt , die Parameter der linearen Regression für die Gesamtinselfläche finden sich in Tab.3a .

3.1.3 Theoretische Ableitung der Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung präcanceröser Veränderungen

Die allgemeine Gültigkeit der hier gefundenen Zeit-Wirkungs-Beziehungen konnte in einem Parallelversuch, in dem neben derselben DÄNA-Dosierung zusätzlich 0,1% Phenobarbital im Trinkwasser angeboten wurde, bestätigt werden. Der Anstieg aller 3 gemessenen Parameter war mit der Steigung der entsprechenden Größen unter fortlaufender alleiniger DÄNA-Applikation identisch (s. Abb.16). Unter der Vorstellung, daß Substanzen, welche den DÄNA-Metabolismus beeinflussen, eine applizierte DÄNA-Dosis bezüglich ihrer carcinogenen Wirksamkeit verändern, also im Falle des Phenobarbital die DÄNA-Effektivdosis gesenkt wird, ist der Abstand der Regressionsgeraden von der Dosisdifferenz abhängig. Dieser Abstand zweier Regressionsgeraden in Richtung der Abszisse $\Delta \lg t$ (s. Abb.8) geht im Falle der Gesamtinselfläche-Zeit-Beziehung wie folgt in die umgeformte, nach lg t aufgelöste Gleichung 1 ein:

Gleichung 4

$$\lg t = \frac{\lg F - \lg K_f}{4,9} + \Delta \lg t$$

Um errechnen zu können, welcher Wirkdosis eine Veränderung der enzymfreien Gesamtfläche entspricht, ist die Kenntnis der Dosis-Zeit-Beziehung präneoplastischer Veränderungen erforderlich. In der Annahme, daß die von Druckrey gefundene und für Durchfütterungsbedingungen gültige Dosis-Zeit-Beziehung $d \times t^{2,3} = K_d$ oder $\lg d + 2,3 \times \lg t = \lg K_d$ nicht nur für die Kriterien Tumortod und Auftreten eines tastbaren

Tumors, sondern auch für definierte präcanceröse Stadien zutrifft, läßt sich diese Gesetzmäßigkeit mit der gefundenen Zeit-Wirkungs-Beziehung der Gesamtinselfläche F verknüpfen.

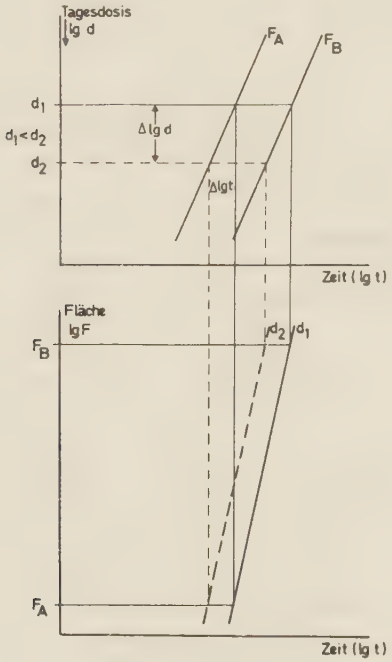


Abb. 8 : In der Annahme der Gültigkeit der Dosis-Zeit-Beziehung $d \times t^{2,3} = K_d$ (Schaubild oben) auch für Praecancerosen, läßt sich diese mit der gefundenen Zeit-Wirkungs-Beziehung $F = t^{4,9} \times K_f$ (Schaubild unten) in Beziehung setzen und daraus die Dosis-Zeit-Wirkungsabhängigkeit ermitteln.

Aus der von Druckrey gefundenen Beziehung $\lg d + 2{,}3 \times \lg t = \lg K_d$ für eine definierte Gesamtinselfläche F läßt sich nach Abbildung 8 der Abstand $\Delta \lg t$, welcher die beiden, verschiedenen Dosen d_1 und d_2 zugehörigen Regressionsgeraden trennt, errechnen:

Gleichung 5 $$\Delta \lg t = \frac{\lg K_d - \Delta \lg d}{2{,}3}$$

Durch Einsetzen von Gl. 5 in Gl. 4 verschiebt sich die nach Gl. 1 umgeformte Beziehung $\lg t = \frac{\lg F - \lg K_f}{4{,}9}$ parallel in Richtung der Abszisse (lg t) in Abhängigkeit von der Tagesdosis:

$$\lg t = \frac{\lg F - \lg K_f}{4{,}9} + \frac{\lg K_d - \Delta \lg d}{2{,}3}$$

$$\lg t = \frac{1}{4{,}9} \lg \frac{F}{K_f} + \frac{1}{2{,}3} \lg \frac{K_d}{d}$$

$$\lg t = \lg \frac{2{,}3\ F}{4{,}9\ d} \times K$$

$$t \times d \frac{1}{2{,}3} = F \frac{1}{4{,}9} \times K$$

$$d \times t^{2{,}3} = F^{\frac{1}{2{,}3}} \times K^{2{,}3} \qquad \text{(Gleichung 6)}$$

Die gewonnene Gleichung 6 ist die alle 3 Variablen berücksichtigende Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung für die DÄNA-Carcinogenese unter Durchfütterungsbedingungen.

Es gilt für F = konstant: $d \times t^{2,3} = K_d$

für t = konstant: $F = d^{2,1} \times K_t$

für d = konstant: $F = t^{4,9} \times K_f$

Unter der Voraussetzung, daß die für Tumoren ermittelte Dosis-Zeit-Beziehung $d \times t^{2,3} = K_d$ auch für präcanceröse Veränderungen gültig ist, kann die Dosis-Wirkungs-Beziehung $F = d^{2,1} \times K_t$ aus der experimentell gewonnenen Zeit-Wirkungs-Beziehung $F = t^{4,9} \times K_f$ theoretisch abgeleitet werden.

3.1.4 Experimentelle Verifizierung der Gültigkeit von $d \times t^{2,3} = K_d$ für Präcancerosen.

Zur Überprüfung der postulierten Gültigkeit der für die Tumorbildung gefundenen Dosis-Zeit-Beziehung auch für präcanceröse Veränderungen wurde die Richtigkeit der hiermit errechneten Dosis-Wirkungs-Beziehung $F = d^{2,1} \times K_t$ experimentell untersucht. Dazu wurden Kollektiven von je 5 Tieren 20 und 30 Tage lang DÄNA-Tagesdosen von 2-10 mg/kg KG mit der Schlundsonde appliziert. Für beide Behandlungszeiten konnte nach Abbildung 9 die theoretisch errechnete Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit mit einer Steigung von 2,1 experimentell bestätigt werden. Die Gültigkeit der Dosis-Zeit-Beziehung $d \times t^{2,3} = K_d$ für Präcancerosen war damit indirekt nachgewiesen.

Grund für die Errechnung der Dosis-Wirkungsbeziehung bei konstanter Zeit und deren experimentelle Bestätigung war,

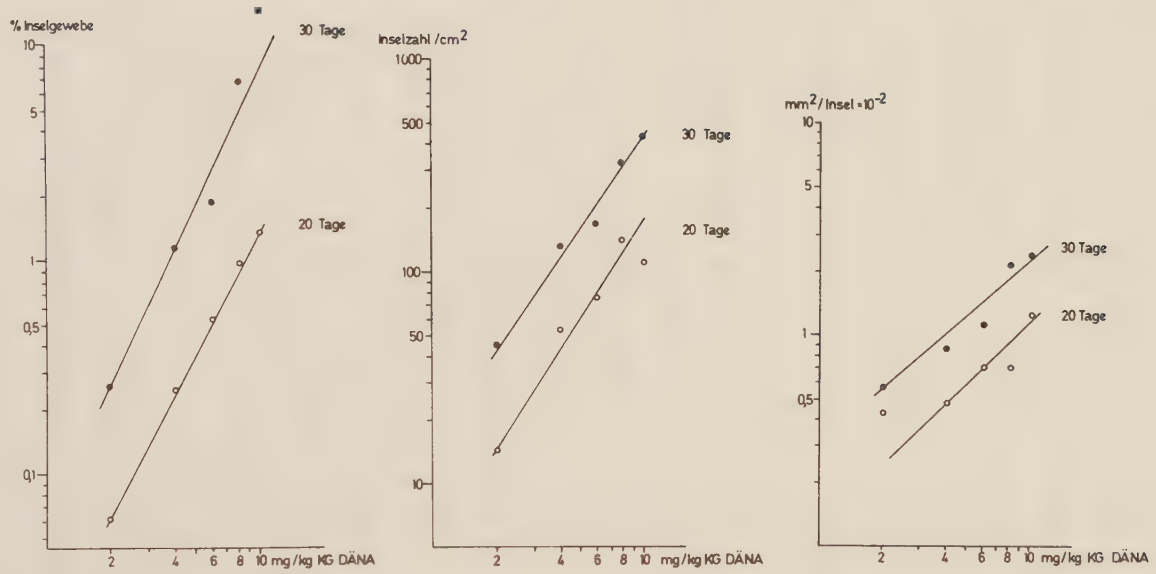


Abb. 9 : Durchfütterung mit täglich 2 - 10 mg/kg KG DÄNA perSchlundsonde über 20 bzw. 30 Tage.

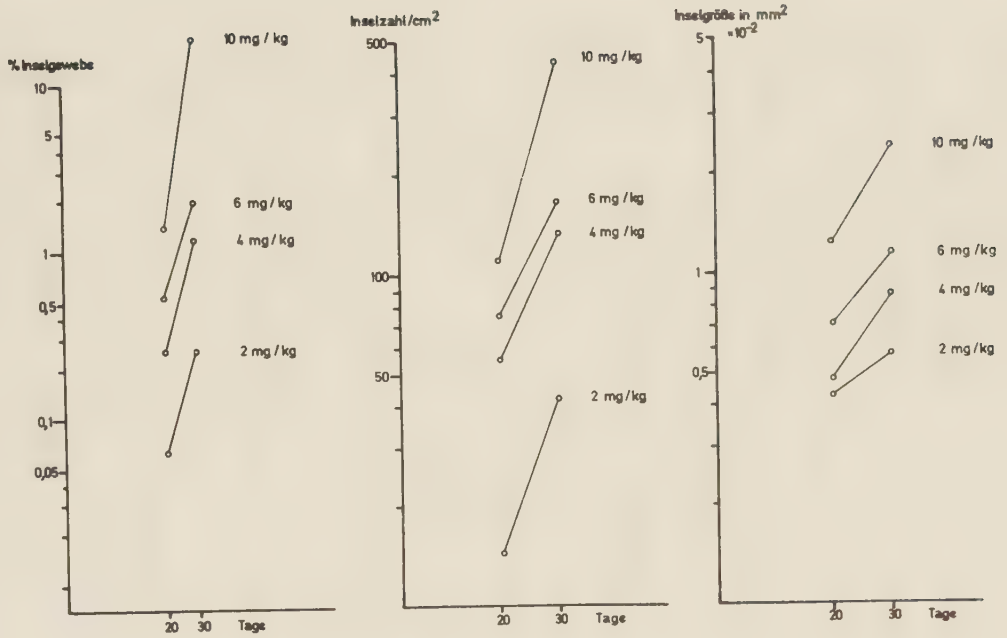


Abb. 10 : Applikation von täglich 2-10 mg/kg KG DÄNA 20 bzw.30 Tage lang .

herauszufinden, welcher Dosisreduktion die unter Phenobarbital beobachtete Wirkungsverminderung entspricht. Zwei DÄNA-Behandlungszeiten wurden in diesem Versuch deshalb gewählt, um gleichzeitig die aus dem DÄNA-, DÄNA-Phenobarbital-Durchfütterungsversuch (siehe Abb.16) gefolgerte Gültigkeit der Zeit-Wirkungs-Beziehung $F = t^{4,9} \times K_f$ für verschiedene DÄNA-Tagesdosen zu überprüfen. Tatsächlich ergibt die Darstellung der Zunahme des prozentualen Inselgewebes in Abhängigkeit von der DÄNA-Applikationszeit in Abbildung 10 für verschiedene Dosierungen annähernd parallele Geraden mit einem mittleren Anstiegswinkel von 76°. Der Steigungswinkel der entsprechenden Darstellung im besprochenen Durchfütterungsversuch (Abb. 7) betrug $78,5^{\circ}$. Die Inselzahl und -größe in Abbildung 10 stiegen mit gemittelten Winkeln von 68° bzw. $49,5^{\circ}$ an. Die differierenden Steigungen in den beiden letztgenannten Darstellungen sind wohl auf statistische Schwankungen zurückzuführen, da sämtliche Geraden lediglich durch zwei, den Behandlungszeiten zugeordnete Punkte bestimmt sind. Dabei unterliegt die Gesamtinselfläche als Produkt aus Inselzahl und -größe geringeren statistischen Schwankungen.

3.1.5 Graphische Ableitung der Dosis-Zeit-Beziehung

$$d \times t^{2,3} = K_d$$

Aus dem linken Diagramm in Abbildung 10 läßt sich nach Abbildung 11 die Dosis-Zeit-Beziehung für eine definierte Wirkung ableiten, indem die zur Erreichen einer bestimmten Inselfläche (im Beispiel 1%) benötigten Zeiten unter

Anwendung verschiedener DÄNA-Tagesdosen im Dosis-Zeit-Diagramm eingetragen werden.

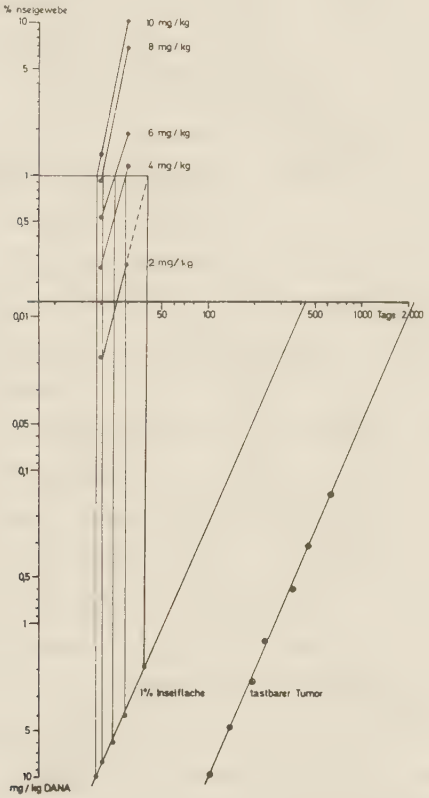


Abb. 11 : Ableitung der Dosis-Zeit-Beziehung $dxt^{2,3} = K_d$ (Schaubild unten) für eine definierte Wirkung (z.B. 1% Inselgewebe) aus einem Durchfütterungsversuch mit verschiedenen DÄNA-Dosierungen. Siehe Abb. 10 .

In dasselbe Schaubild wurde die von Druckrey ermittelte Dosis-Zeit-Abhängigkeit für das Auftreten eines tastbaren Tumors eingezeichnet. Der Vergleich beider Geraden zeigt bei gleicher Steigung von 2,3 die Gültigkeit der Beziehung $d \times t^{2,3} = K_d$ sowohl für den diagnostizierbaren Tumor als auch für definierte präcanceröse Stadien. Nach Abbildung 11 läßt sich ein präcanceröses Stadium mit einem Inselgewebeanteil von 1% in 1/5 der zur Tumorentwicklung benötigten Zeit nachweisen. Der Vorteil einer Bestimmung enzymfreier Carcinomvorstufen liegt demnach insbesondere in der Beurteilung der Wirkung kleinster Carcinogendosen innerhalb der Grenzen der natürlichen Überlebenszeit sowie in der schnellen Gewinnung von Resultaten bei höheren Dosen.
Mit den bisher experimentell gewonnenen und für die untersuchten Dosisbereiche gültigen Gesetzmäßigkeiten lassen sich umfassende Aussagen über die Effekte kontinuierlicher DÄNA-Exposition machen. So ist eine Prognose der Wirkung bei bekannter täglicher Dosis und Einwirkungszeit sowie der für einen bestimmten Effekt notwendigen Expositionszeit möglich. Wegen der dosisunabhängigen Steigung der Zeit-Wirkungs-Geraden ist es einmal möglich, für jede gemessene Inselfläche bei bekannter Applikationszeit durch Extrapolation den Zeitpunkt zu ermitteln, der für das Erreichen einer definierten Fläche unter der jeweiligen Dosierung charakteristisch ist. Die korrespondierende Dosis kann dann aus der Dosis-Zeit-Geraden abgelesen werden. Ohne graphische Darstellung kann die Dosis aus den bekannten Werten Zeit und Inselfläche nach der Gleichung 6

$$d \times t^{2,3} = F^{\frac{1}{2,3}} \times K^{2,3}$$

berechnet werden. Bei Einsetzen der experimentell ermittelten numerischen Werte ist K = 51,1 . Damit lautet die Formel der Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung der DÄNA-Carcinogenese für Durchfütterungsbedingungen

$$d \times t^{2,3} = F^{\frac{1}{2,3}} \times 8500 \frac{mg \times Tage}{kg\ KG \times \%}$$

2.1.6 Zeitabhängige Entwicklung der ATPase-Defekte nach Absetzen des Carcinogens

Freksa et al. beschrieben ein Gleichbleiben von Inselzahl und Inselfläche während eines Zeitraums von ca. 5 Wochen nach Einstellung der Carcinogenzufuhr und danach ein autonomes Weiterwachsen der Inseln. Da hierüber exakt quantitative Daten fehlen, wurde dies in 3 Versuchsreihen mit unterschiedlichen Dosierungen, Applikationsarten und Zeitbedingungen untersucht. Einmal wurden die Tiere sofort, 4, 6, 8, 10, 12 und 16 Wochen im Anschluß an eine 3-wöchige DÄNA-Behandlung mit täglich 5 mg/kg KG DÄNA per Schlundsonde (Gesamtdosis 90 mg/kg KG) untersucht. Der prozentuale Inselgewebeanteil stieg dabei mit einem Winkel von 61° linear im doppelt logarithmischen System an. Diese Steigung ist identisch mit derjenigen des mittleren Inselwachstums unter Durchfütterungsbedingungen. Nach Abbildung 12 und Tabelle 5 ist dieses Wachstum in den ersten 10 Wochen vorwiegend auf ein Ansteigen der Inselzahl zurückzuführen, während die mittlere Inselgröße verzögert ansteigt. Inwieweit dieses Verhalten auf eine Wachstumsretardierung induzierter Enzymdefekte oder auf die Zunahme kleiner Inseln

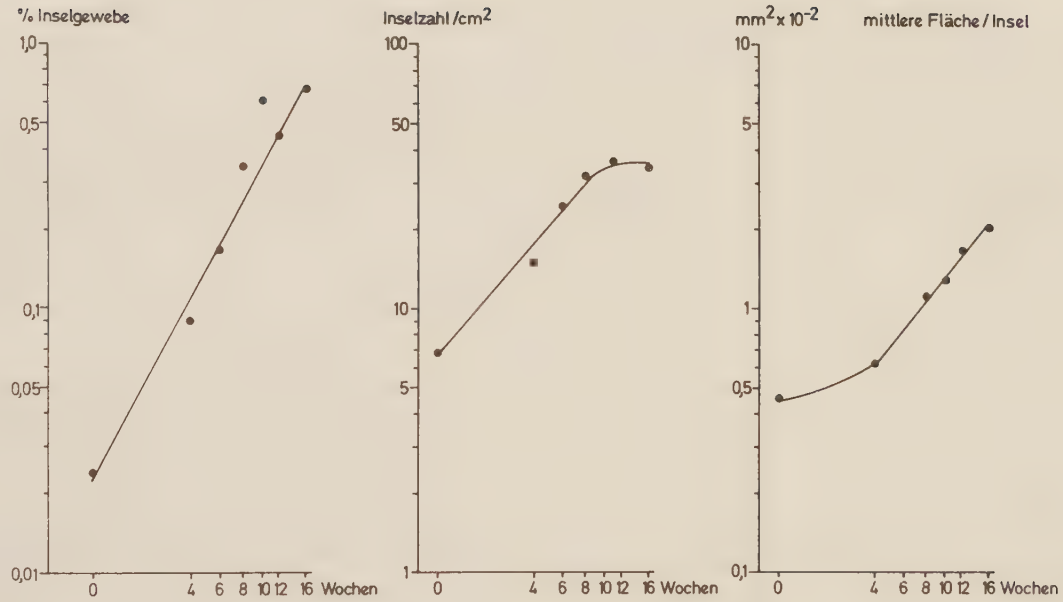


Abb. 12 : Inselwachstum 3, 7, 9, 11, 13, 15 und 19 Wochen nach Beginn einer 3-wöchigen DÄNA-Behandlung mit täglich 5 mg/kg KG.Meßzeitpunkte 0, 4, 6, 8, 12 und 16 Wochen nach Absetzen des Carcinogens .

welche die durchschnittlich Größe der enzymfreien Areale senken, zurückzuführen ist, kann quantitativ nicht beurteilt werden. Doch dürfte ein vermindertes Wachstum angesichts der rapide ansteigenden Zahl enzymfreier Areale weniger für den verzögerten Anstieg der mittleren Größe verantwortlich sein. Nach 10 Wochen scheint es zu einem Gleichbleiben der Zahl zu kommen, während Gesamt- und Einzelfläche der enzymfreien Areale weiter ansteigen. Da jedoch die weiteren Verläufe in Abb. 12 nicht sicher zu beurteilen waren, wurde eine weitere Untersuchung mit längeren behandlungsfreien Intervallen erforderlich. Hierzu wurde den Tieren eine Dosis von 1mg/kg KG DÄNA über 7 Wochen im Trinkwasser angeboten (Gesamtdosis: 50 mg/kg KG). 6, 12 und 44 Wochen nach Absetzen des Carcinogens kamen die Lebern zur Untersuchung. Wie im vorangehenden Versuch schon angedeutet, blieb nach Absetzen des Carcinogens die Zahl der enzymfreien Areale während der Beobachtungszeit konstant. Diese persistierenden enzymdefekten Areale wuchsen im doppelt logarithmischen System linear weiter an und zwar wiederum die mittlere Fläche der enzymfreien Areale und somit bei konstanter Zahl auch die Gesamtfläche mit 57°. (siehe Tab.6 und Abb.13). Zur Prüfung der wichtigen Frage, ob die Entwicklung von Zahl und Fläche der Areale nach Absetzen des Carcinogens wie unter Durchfütterungsbedingungen dosisunabhängig sind, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Gruppen von je 5 Tieren 6, 11, 15 und 21 Wochen nach einer 10-tägigen Behandlungszeit mit 2 und 4 mg/kg KG DÄNA untersucht. In den ersten Wochen nach Einstellung der Carcinogenzufuhr ergaben sich in Abhängigkeit

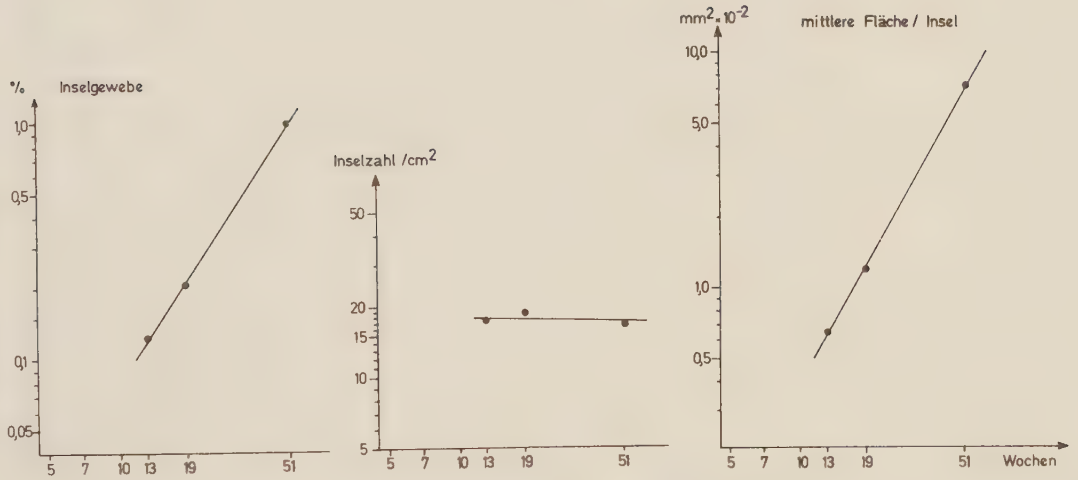


Abb. 13 : 7-wöchige Behandlung mit 1 mg/kg KG DÄNA im Trinkwasser. 6, 12 und 44 Wochen nach Beendigung der Exposition kamen die Tiere zur Auswertung .

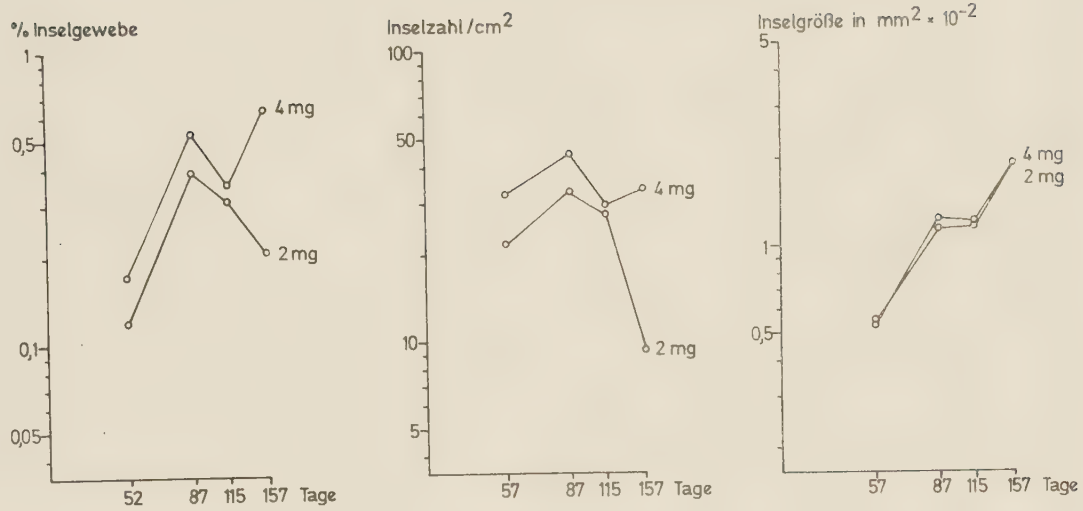


Abb. 14 : 6, 11, 15 und 21 Wochen nach Beginn einer 10-tägigen DÄNA Behandlung mit 2 und 4 mg/kg KG pro Tag kamen die Tiere zur Auswertung .

von der Einzeldosis unterschiedliche Verläufe. Unmittelbar nach Applikationsstop stieg die Inselzahl bei beiden Dosierungen bis zu einem Maximum in der 11. Woche an und fiel danach in überraschender Weise ab. Dies war besonders ausgeprägt bei den mit 2 mg/kg KG behandelten Tieren, während bei höherer Dosis der Abfall geringer war und schon nach wenigen Wochen die steady-state-Phase der Inselzahl erreicht wurde.Das Wachstum der Einzelinseln verlief mit Ausnahme eines kurzen, mit der Abnahme der Inselzahl zusammenfallenden Intervalls mit der bekannten Steigung von 60° weiter (Tab.7 und Abb. 14). Nach Absetzen des Carcinogens ist also, abgesehen von einer mehrwöchigen Übergangsphase, wie unter Durchfütterungsbedingungen der Anstieg der Gesamtinselfläche F mit der Zeit unabhängig von der Einzeldosis d und der Gesamtdosis D. Somit folgt die Zeit-Wirkungs-Beziehung auch hier einer dosisunabhängigen Gesetzmäßigkeit, die sich aus dem gemittelten Anstiegswinkel von 59° ableiten läßt: $F = t^{1,66} \times K_a$. Unter gleichen Zeitbedingungen mit verschiedenen Dosierungen behandelte Tiergruppen zeigen nach Absetzen parallele Verläufe der Entwicklung ihrer Präcancerosen mit gleichbleibendem Abstand der logarithmierten Ordinatenwerte (siehe Abb. 15). Die Flächenverhältnisse bleiben auch nach abgeschlossener DÄNA-Exposition gleich, was bedeutet, daß wie unter Durchfütterungsbedingungen nach $F = d^{2,1} \times K_t$ aus Flächenverhältnissen Dosisdifferenzen errechnet werden können. Dies ist von praktischer Bedeutung bei den nachfolgend beschriebenen Kombinationsversuchen.

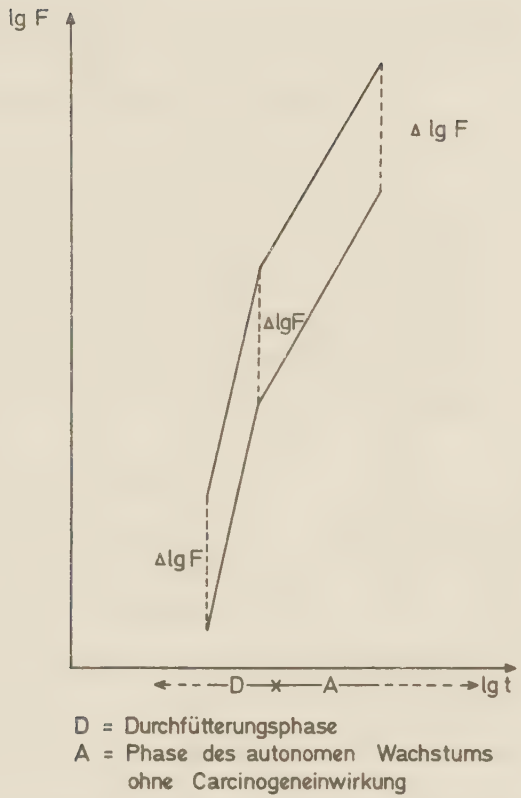


Abb. 15 : Nach Absetzen des Carcinogens verlaufen die Gesamtinselflächen der mit verschiedenen Dosen behandelten Tiergruppen parallel. Auch in dieser Phase lassen sich daher nach $F = t^{1,66} \times K_a$ aus den gleichbleibenden Flächenverhältnissen die Dosisverhältnisse errechnen .

3.2 Beeinflussung der DÄNA-Carcinogenese durch Induktoren und Inhibitoren der oxidativen Hydroxylierung

Als Initialschritt der DMNA-Carcinogenese ist die oxidative Demethylierung und Abspaltung von Formaldehyd eine P-450-abhängige Reaktion, welche nur in Anwesenheit von Mikrosomen, O_2 und NADPH abläuft (Appel, 1976). Ohne diese Komponenten findet weder eine Formaldehydbildung, noch eine Alkylierung von Makromolekülen statt, welche für die Transformation zur Tumorzelle verantwortlich gemacht wird. Dementsprechend wäre unter Induktorsubstanzen wie Phenobarbital bzw. Inhibitoren wie Halothan eine Steigerung bzw. Hemmung der Tumorinzidenz zu erwarten. Interferenzversuche mit den genannten Substanzen ergaben jedoch entgegengesetzte Resultate (Kunz et al., 1967, 1969). Ausgehend von dieser Diskrepanz zwischen theoretisch zu erwartender und gefundener Carcinominzidenz wurde die Beeinflussung von präcancerösen DÄNA-Veränderungen durch definierte Induktoren bzw. Inhibitoren der mikrosomalen Metabolisierungsenzyme untersucht.

3.2.1 Beeinflussung der DÄNA-Wirkung durch Phenobarbital

Phenobarbital induziert als unspezifischer Induktor mischfunktioneller Oxidasen das gesamte P-450 Monoxygenasesystem und stimuliert den Abbau und die Entgiftung verschiedenster Substrate. In einer Dosierung von 0,1% im Trinkwasser bewirkt es eine starke Erhöhung des relativen Lebergewichts, welche im wesentlichen auf eine Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums zurückzuführen ist (Remmer, 1964). Maximale Effekte treten nach 7-10 Tagen auf (Kunz et al., 1966),

weshalb jeweils 1 Woche vor Versuchsbeginn Phenobarbital im Trinkwasser mit unterschiedlichen DÄNA-Dosierungen und -Applikationsarten angeboten wurde:

Parallel zu dem unter 3.1.2 beschriebenen Durchfütterungsversuch kamen unter gleichen Dosis-Zeit-Bedingungen DÄNA und Phenobarbital kombiniert zur Anwendung (Tab. 3). Die Zeit -Wirkungs-Verläufe aller 3 gemessener Parameter zeigten bei gleicher Steigung der Geraden einen zur DÄNA-Kontrolle parallel nach rechts verschobenen Verlauf (Abb. 16). Der parallele Anstieg beweist nach den in 3.1.4 besprochenen Versuchen eine konstante Reduktion der täglich eingesetzten DÄNA-Dosis durch Phenobarbitalinduktion. Dabei ist die Behandlungsdauer t zur Erzielung desselben Effektes (Gesamtinselfläche F) um 17% erhöht. Daraus errechnet sich nach der Dosis-Zeit-Beziehung $d \times t^{2,3} = K_d$ unter Phenobarbital eine DÄNA-Dosis-Reduktion von 30,3%. Bei gleicher Behandlungsdauer entsteht unter Phenobarbitalinduktion eine Gesamtinselfläche von nur 50%, eine Inselzahl von 66,2% und eine mittlere Inselfläche von 77% der DÄNA-Kontrolle. Auch hieraus läßt sich die Dosisreduktion von 28,12% nach der Beziehung $F = d^{3,1} \times K_t$ errechnen (vgl. 3.1.4). Diese Befunde korrelieren eng mit Cancerisierungsversuchen an Mäusen (Kunz et al., 1969), bei denen unter Phenobarbital eine um 20% verlängerte Überlebenszeit sowie eine Reduktion der Zahl bösartiger Lebertumoren um 26% gegenüber der DÄNA-Kontrolle auftraten.

Gleichartige Verhältnisse zeigte auch der Kombinationsversuch DÄNA-Phenobarbital mit einer Dosierung von 5 x 10 mg/kg KG

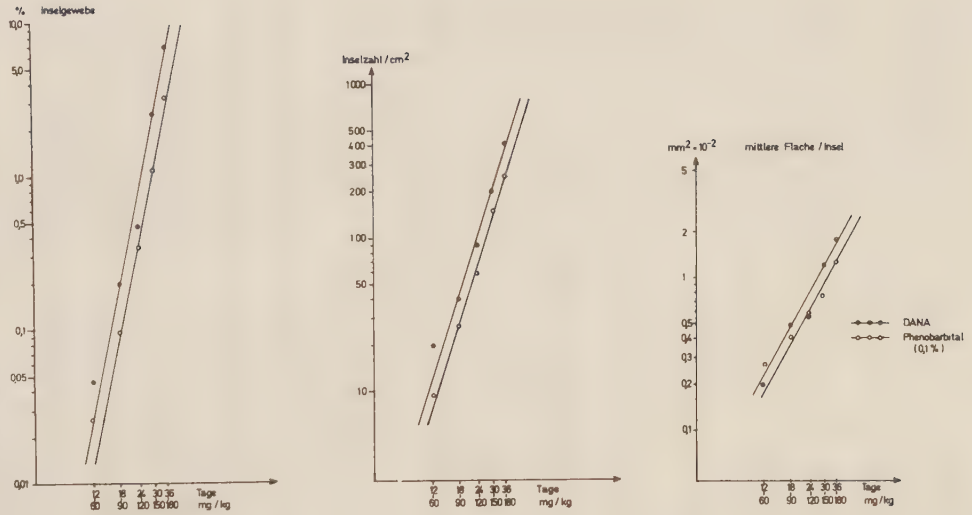


Abb. 16 : Durchfütterung mit täglich 5 mg/kg KG DÄNA und DÄNA & Phenobarbital über 2 - 6 Wochen (Gesamtdosis 60 - 180 mg/kgKG DÄNA) . Vgl.Abb.7.

DÄNA i.p. an 5 aufeinanderfolgenden Tagen und einem behandlungsfreien Intervall von 38 Wochen (Tab. 8 und Abb. 17).

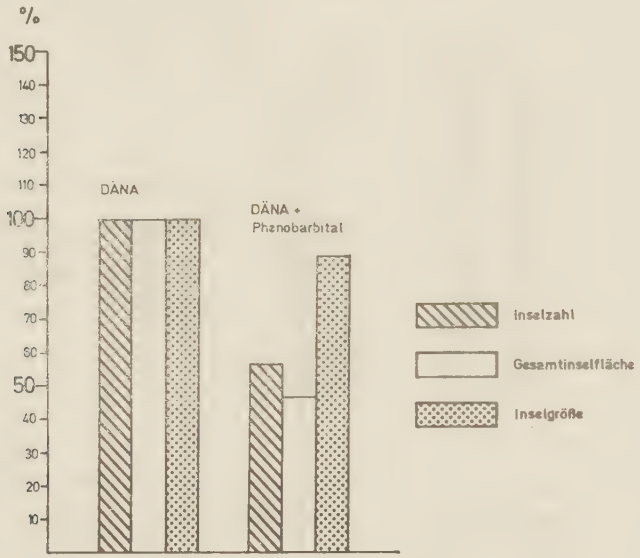


Abb. 17 : Vergleich der Wirkung von 5x10 mg/kg KG DÄNA mit derjenigen von DÄNA in Kombination mit Phenobarbital.

Wie in 3.1.6 erläutert, können auch nach längeren behandlungsfreien Intervallen aus den konstant bleibenden Flächenverhältnissen Dosisveränderungen nach $F = d^{2,1} \times K_t$ errechnet werden. Im vorliegenden Fall betrug die Dosisreduktion 30,6% bei hoch signifikant erniedrigter Gesamtinselfläche von 46,5% der DÄNA-Kontrolle ($p < 0,001$). Bestätigt wurden diese Resultate in einem in 3.2.5 näher beschriebenen Intervallversuch von 4 x 20 mg/kg KG DÄNA bzw. DÄNA und Phenobarbital i.p., wobei es unter Phenobarbital zu einer hoch signifikant

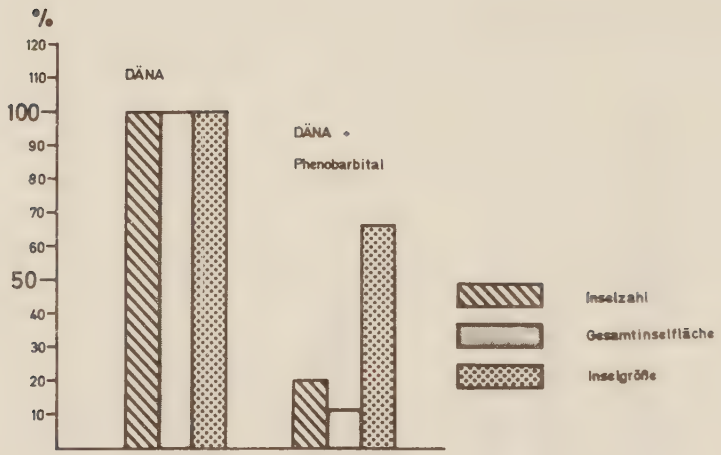


Abb. 18 : Applikation von täglich 5 mg/kg KG DÄNA im Trinkwasser über 4 Wochen alleine und in Kombination mit Phenobarbital .

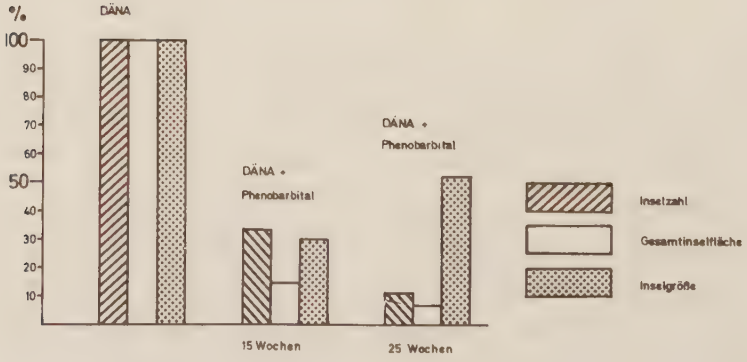


Abb.19 : Applikation von täglich 0,1 mg/kg KG DÄNA im Trinkwasser über 15 bzw. 25 Wochen alleine und in Kombination mit Phenobarbital .

($p < 0{,}001$) erniedrigten Gesamtinselfläche von 50% der DÄNA-Kontrolle kam, entsprechend einer Dosisreduktion von 28% (siehe Tab. 15 und Abb.25).

Quantitativ andere Ergebnisse wurden erhalten, wenn DÄNA in einer Dosierung von 5 mg/kg KG kontinuierlich über 24 Stunden verteilt in Trinkwasser angeboten wurde. Bei 4-wöchiger DÄNA-Applikation mit einer Gesamtdosis von 140 mg/kg KG und einem behandlungsfreien Intervall von 5 Wochen ist die prozentuale Inselfläche hoch signifikant ($p < 0{,}001$) auf 11,5% der DÄNA-Kontrolle reduziert, entsprechend einer Dosisreduktion von 65,5%, also doppelt so stark wie bei Applikation der gleichen Dosis mit der Schlundsonde (Tab. 9 und Abo. 18). Die Ursache dieser ausgeprägteren Dosisverminderung ist möglicherweise darin zu sehen, daß ständig anfallende kleinste Carcinogendosen durch ein maximal aktiviertes Cytochrom P-450-System weitgehend entgiftet werden können, während die entgiftende Komponente des Metabolisierungssystems durch kurzfristig anfallende höhere DÄNA-Dosen offensichtlich überlastet wird. Diese und die folgenden Befunde weisen darauf hin, daß in deminduzierbaren mikrosomalen System nicht nur die für die Bildung des alkylierenden Metaboliten verantwortlichen Komponenten, sondern auch solche mit entgiftender Funktion enthalten sind, wobei letztere in besonderem Maße durch Phenobarbital stimulierbar sein müßten. Bestärkt werden solche Vorstellungen durch Langzeitversuche mit extrem niedriger DÄNA-Dosierung von 0,1 mg/kg KG täglich im Trinkwasser über 15 bzw. 25 Wochen (Tab. 10 und Abb. 19).

Nach 15 Wochen betrug der Anteil enzymfreien Gewebes bei den mit DÄNA und Phenobarbital behandelten Tieren nur 14% der Kontrolle ($p < 0,01$), nach 25 Wochen noch 6,8% ($p < 0,05$). Phenobarbital reduzierte hier die täglich eingesetzten DÄNA-Dosen um 60,8 bzw. 72,2%. Ohne nachweisbare Inseln blieb ein phenobarbitalinduziertes Tier nach 25 Wochen DÄNA-Behandlung, ein 15 Wochen lang exponiertes Tier der Gruppe DPh entwickelte nur eine, aus wenigen Zellen bestehende Insel. Hier scheint das Carcinogen vom exponierten Tier vollständig oder zumindest so weitgehend entgiftet zu werden, daß die Schwelle der Nachweisbarkeit präneoplastischer Veränderungen durch die Erfassung von Enzymdefekten erreicht wird.

3.2.2 Einfluß von Phenobarbital auf die Entwicklung präneoplastischer Veränderungen nach abgeschlossener DÄNA-Exposition.

Den Ergebnissen von 3.1.6 zufolge steigt die prozentuale Fläche ATPase-freien Gewebes nach abgeschlossener Behandlung unabhängig von der Dosierung nach der Gesetzmäßigkeit $F = t^{1,66} \times K_a$ linear im doppelt logarithmischen System an. Erwartungsgemäß verläuft die Entwicklung präneoplastischer Enzymdefekte der Vergleichsgruppe mit simultaner DÄNA-Phenobarbital-Applikation parallel zu der nur mit DÄNA behandelten Gruppe bei weiterbestehender Wirkungsdifferenz.

Um mögliche, von der Beeinflussung des Carcinogenmetabolismus unabhängige Wirkungen von Phenobarbital auf den weiteren Cancerisierungsverlauf zu beurteilen, wurde eine Tiergruppe

DPH im Anschluß an eine 3-wöchige DÄNA-Behandlung von täglich 5 mg/kg KG per Schlundsonde mit Phenobarbital induziert. Um Phenobarbital-bedingte Enzymverteilungsstörungen wie zentrale Aufhellungen zu vermeiden, wurde jeweils eine Woche vor der Untersuchung, 4, 6, 8, 10, 12 und 16 Wochen nach Beendigung der DÄNA-Applikation, das Barbiturat abgesetzt. Nach Tabelle 5 und Abblildung 20 zeigen die Gesamtinselflächen der Gruppe DPH zu allen Untersuchungszeitpunkten gegenüber der DÄNA-Kontrollgruppe erhöhte Werte. Die Erhöhung der Gesamtinselfläche beruht ausschließlich auf einer Zunahme der Zahl enymfreier Areale in den ersten Wochen der Phenobarbitalzufuhr unmittelbar nach Abschluß der DÄNA-Behandlung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden entsprechender Cancerisierungsversuche von Nishizumi (1976) überein. Auch bei Weiterbehandlung mit Phenobarbital sistiert die Zahl nach ca. 8 Wochen, etwa gleichzeitig mit der DÄNA-Vergleichsgruppe. Die Größenzunahme der mittleren Fläche der enzymfreien Areale ist in allen 3 Kollektiven nahezu identisch. Die Wachstumsgeschwindigkeit bereits bestehender enzymfreier Areale wird demnach durch den Induktor Phenobarbital nicht beeinflußt. Die zuletzt beschriebene Versuchsreihe beweist eindeutig, daß die Verminderung der DÄNA-Wirkung durch den Induktor Phenobarbital in der initialen Phase der Carcinogenwirkung, wahrscheinlich auf der Ebene der Carcinogenmetabolisierung, erfolgt.

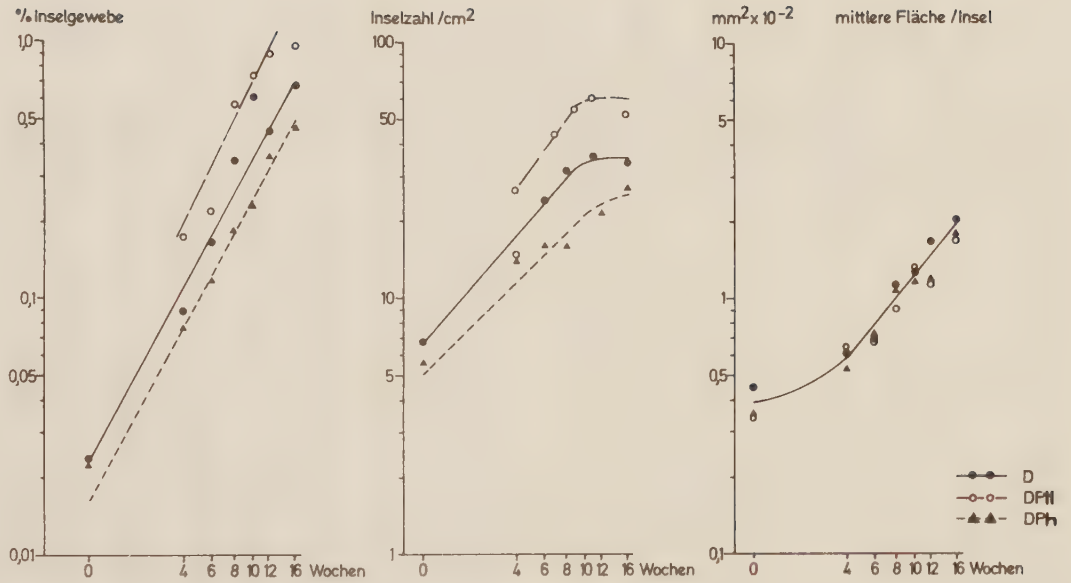


Abb. 20 : 3-wöchige Behandlung mit 5 mg/kg KG DÄNA (D),DÄNA & Phenobarbital simultan (DPh) und mit Phenobarbital im Anschluß an die DÄNA-Exposition (DPH) . Untersuchungstermine sofort, 4, 6, 8, 10, 12 und 16 Wochen nach Beendigung bzw.3, 7, 9, 11, 13, 15 und 19 Wochen nach Beginn der DÄNA-Behandlung.

2.2.3 Wirkung von 3-Methylcholanthren (3-MC) auf die DÄNA-Carcinogenese

3-MC induziert spezifisch Cytochrom P-448, welches vorwiegend für den Abbau polyzyklischer Kohlenwasserstoffe verantwortlich ist (Gelboin et al., 1964), jedoch auch einige andere Substrate metabolisiert. Lebergewicht, Cytochrom b 5, NADPH-Cytochrom-Reduktase sowie die Cytochrom P-450-Funktion werden nur unwesentlich beeinflußt. Es war daher überraschend, daß in Kombination mit DÄNA (8 mg/kg KG über 4 Wochen, Gesamtdosis 192 mg/kg KG) als Cytochrom-P-450-abhängigem Substrat eine gleichartige Beeinflussung der Präcancerosen wie unter Phenobarbital gefunden wurde. Die Gesamtinselausbeute war mit 42,5% hoch signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt, entsprechend einer Reduktion der täglichen Einzeldosis von 33,5%. Eine Metabolisierung von DÄNA durch Cytochrom P-448 ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen. (siehe Tab. 11 und Abb. 21)

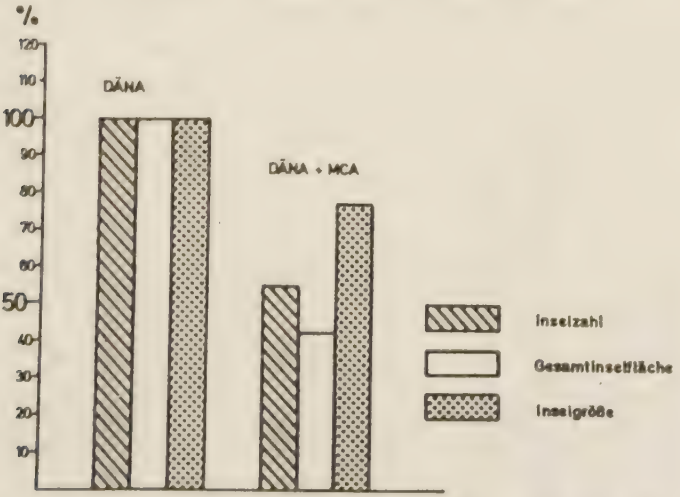


Abb. 21 : Wirkungsvergleich von DÄNA mit DÄNA und 3-MC .

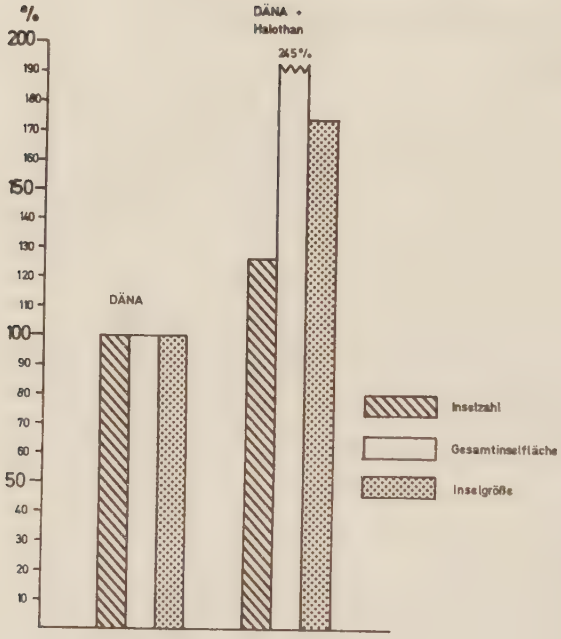


Abb. 22 : Applikation von täglich 5 mg/kg KG DÄNA über 4 Wochen alleine und in Kombination mit Halothan

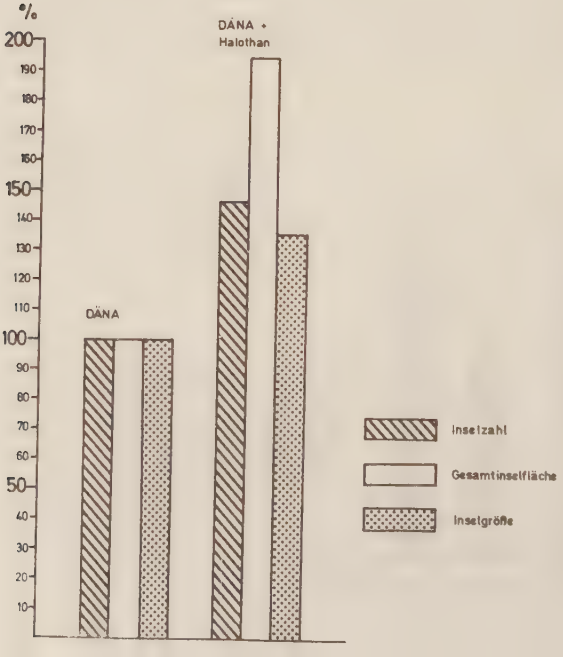


Abb.23 : Applikation von 5x10 mg/kg KG DÄNA und DÄNA + Halothan.

3.2.4 Beeinflussung DÄNA-bedingter Präneoplasien durch Halothan

Halothan bewirkt eine Lebervergrößerung, welche jedoch nicht wie durch Phenobarbital auf eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums mit Steigerung der Aktivität mikrosomaler Enzyme zurückzuführen ist (Kunz et al., 1966 ; Remmer, 1962, 1964). Es besitzt ein Typ I Bindespektrum durch Reaktion mit dem Apoprotein des Cytochrom P-450-Komplexes und hemmt damit kompetitiv die Metabolisierung anderer Typ I-Substrate wie Nitroanisol (Rickart, 1974). Maßgeblich für die Bindung an das Protein ist das unveränderte Halothanmolekül. Dessen Abbauprodukt geht eine Ligandenbindung mit dem Cytochromeisen ein und ist möglicherweise auch für die kovalente Bindung an mikrosomales Protein verantwortlich (Mansuy et al., 1974). Außerdem steigert Halothan den Elektronenabfluß über den Cyanid-sensitiven Faktor zu den Fettsäuren, welche damit der Endoxidase entzogen werden (Berman et al , 1975). Nach den vorausgegangenen Befunden der Wirkung von Induktoren auf DÄNA-induzierte Präcancerosen war logischerweise unter Halothan eine entgegengesetzte Beeinflussung der Inselbildung zu erwarten.

Unter 4-wöchiger Durchfütterung mit täglich 5 mg/kg KG DÄNA per Schlundsonde bewirkt eine 1-stündige Halothanbegasung unmittelbar vor der DÄNA-Applikation eine Steigerung der Gesamtinselfläche auf 245% entsprechend einer Wirkdosissteigerung von 53,2% (Tab. 12 und Abb. 22).

Bei intraperitonealer Injektion von 5 x 10 mg/kg KG DÄNA an aufeinanderfolgenden Tagen und einem behandlungsfreien Intervall von 38 Wochen steigerte Halothan die Gesamtinselfläche hoch signifikant auf 195% ($p < 0{,}0005$), woraus sich eine Steigerung der Wirkdosis von 37,4% errechnet. Diese Befunde stehen in Einklang mit Cancerisierungsversuchen an Mäusen, bei denen Halothan in Kombination mit DÄNA zu einer Vermehrung der hepatozellulären Carcinome führte (Kunz et al., 1969), (siehe Abb. 23 und Tab. 13).

3.2.5 Beeinflussung der DÄNA-Carcinogenese durch SKF 525 A-Inhibition

Wegen der vielfältigen Angriffspunkte von Halothan im Zellstoffwechsel wurde die Wirkung definierter Mikrosomeninhibitoren geprüft. Eine Hemmung der Biotransformation von Pharmaka durch SKF 525 A wurde erstmals 1953 von Cook et al. beschrieben, welche eine Steigerung der analgetischen Wirkung von Opiaten beobachteten. Die Hemmung des mikrosomalen Oxygenasesystems wurde anfangs mit der Entkopplung des mikrosomalen Elektronentransports erklärt (Netter, 1962), beruht jedoch auf der Reaktion von SKF 525 A mit dem Apoprotein des Cytochrom P-450-Systems. Die Verdrängung des Substrates vom spezifischen Typ I Bindungsort erklärt die kompetitive Hemmung der Transformation von Typ I Substraten (Mannering, 1966, 1969, 1977). DMNA kann aufgrund seines Bindungsspektrums den Typ I Substraten zugeordnet werden. Dafür spricht auch die Steigerung seiner Demethylierung durch Zugabe von NADH zum NADPH-regenerierenden System, die bei Typ II Substraten nicht beobachtet wird (Appel,1976,

Correia et al., 1973). Demnach wäre auch für DÄNA in Kombination mit SKF 525 A in Umkehrung der Phenobarbitalwirkung eine Erhöhung der Präcanceroseninzidenz zu erwarten. Unter der Behandlung mit 5 x 10 mg/kg KG DÄNA an aufeinanderfolgenden Tagen war jedoch die Inselfläche auf 81% der DÄNA-Kontrolle reduziert (siehe Tab. 14 und Abb. 24).

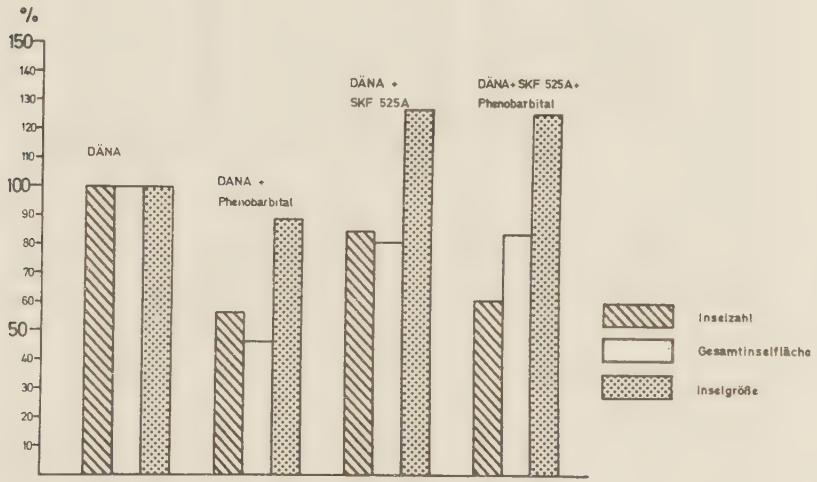


Abb. 24 : Applikation von 5x10 mg/kg KG DÄNA,DÄNA + Phenobarbital, DÄNA + SKF 525 A , DÄNA + Phenobarbital +SKF 525 A an 5 aufeinanderfolgenden Tagen.

Diese Dosisreduktion von 10% wird damit erklärt, daß SKF 525 A die Cytochrom P-450 Funktion nur initial hemmt, später, besonders nach wiederholter Anwendung, wie Phenobarbital induziert (Schenkman et al., 1972). Die Entstehung von Formaldehyd aus DMNA ist in den ersten Stunden nach der Injektion von SKF 525 A gehemmt, steigt aber nach ca. 15 h

mit zunehmendem Cytochrom P-450-Gehalt an, während sich die Alkylierungsrate genau umgekehrt verhält (Appel, 1976). Um isoliert die inhibitorische Wirkung auf die Cytochrom P-450-Funktion zu erfassen, wurde DÄNA innerhalb der Hemmphase, 1 h nach der SKF 525 A-Injektion, zugeführt. Erst nach einem 4-wöchigen Intervall, in dem sich die SKF 525 A-bedingte Induktion zurückbilden konnte, wurde in einem weiteren Versuch die darauffolgende Applikation in gleicher Weise vorgenommen. Nach viermaliger, diesem Behandlungsschema folgender DÄNA-SKF 525 A-Applikation war die Gesamtinselfläche auf 490,5% gesteigert, was einer Wirkdosissteigerung von 113,25% entspricht. Bei kombinierter Anwendung von DÄNA, SKF 525 A und Phenobarbital interferierten die Wirkungen von Cytochrom P-450-Induktor und -Inhibitor. Die Wirkungssteigerung von SKF 525 A sowie die Wirkungsreduktion durch Phenobarbital waren nahezu aufgehoben. Aus dem Ergebnis dieses Versuchs, in dem in einem induzierten Monoxygenasesystem nur die Endoxydase gehemmt war, kann geschlossen werden, daß die Bildung alkylierender Metaboliten nicht durch die Flavoproteidkomponente des mikrosomalen Systems katalysiert wird. (siehe Tab. 15 und Abb. 25).

3.2.6 Beeinflussung der DÄNA-Wirkung durch Metyrapon

Der zweite untersuchte Cytochrom P-450-Inhibitor Metyrapon (Netter et al., 1967, 1969) lagert sich an das zentrale Eisenatom des Cytochrom P-450 an und verhindert so im reduzierten Zustand die Anlagerung von CO (Petersen et al., 1971), was bedeutet, daß es die 6. Koordinationsstelle,

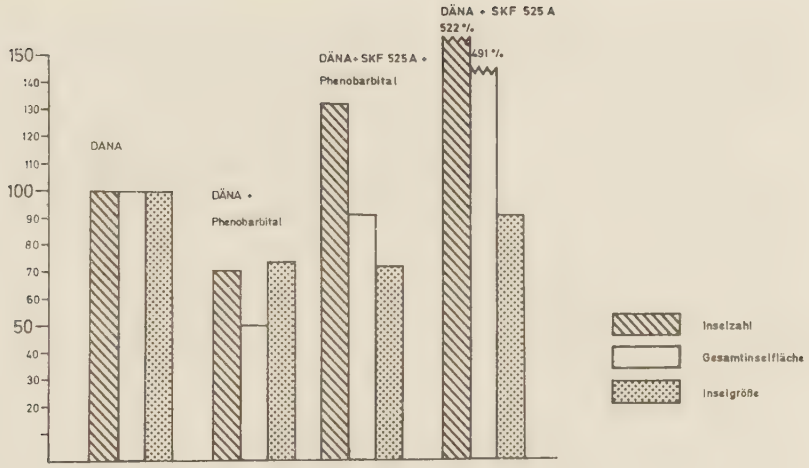


Abb. 25 : Intervallbehandlung mit 4x20 mg/kg KG DÄNA , DÄNA + Phenobarbital, DÄNA + Phenobarbital + SKF 525 A und DÄNA + SKF 525 A im Abstand von 4 Wochen.

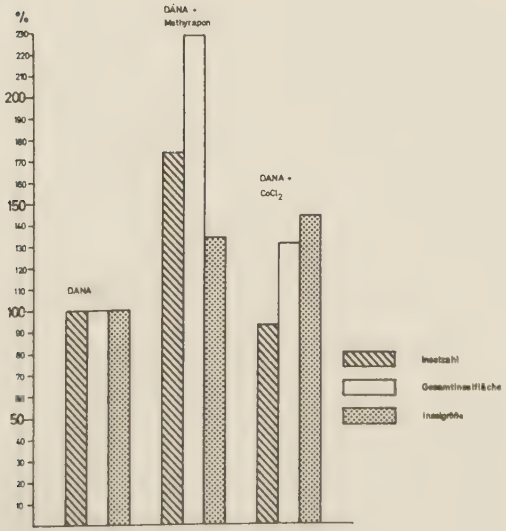


Abb. 26 : Applikation von 5x10 mg/kg KG DÄNA, DÄNA + Metyrapon und DÄNA + $CoCl_2$.

den Ort der O_2-Bindung, besetzt. Da nach Untersuchungen von Leibmann (1969, 1971, 1973) Inhibitoren vom Typ II wie Metyrapon auch die Biotransformation von Typ I Substraten wie DÄNA hemmen, waren qualitativ gleichartige Effekte wie unter SKF 525 A -Inhibition zu erwarten. So ist in der Kombination von 5 x 10 mg/kg KG DÄNA und Metyrapon der prozentuale Anteil ATPase-freier Areale hoch signifikant ($p < 0{,}001$) auf 229% der DÄNA-Kontrolle vermehrt. Die Wirkdosissteigerung betrug 48,4% (siehe Tab. 16 und Abb.26).

3.2.7 Einfluß von Kobaltchlorid auf die DÄNA-Carcinogenese

Durch $CoCl_2$-Injektionen konnte Tephly und Hibbeln (1971) den Gehalt an Cytochrom P-450 sowie die mikrosomale N-Demethylierung von Äthylmorphin verhindern. Weitgehend unbeeinflußt blieben die Gehalte an Cytochrom b 5 und NADPH-Cytochrom C-Reduktase. Es ist daher möglich, aus der Beeinflussung der Inselentstehung durch $CoCl_2$ weitere Hinweise zu erhalten, ob und in welchem Ausmaß die NADPH-Cytochrom C-Reduktase am DÄNA-Metabolismus beteiligt ist. Allerdings war eine hohe Dosierung mit ausgeprägter Wirkung auf die mikrosomale Metabolisierung wegen erheblicher toxischer Nebenreaktionen nicht möglich. Unter der tolerierten Dosis von 40 mg/kg KG $CoCl_2$ subkutan kam es bei 10 mg/kg KG DÄNA an 5 aufeinanderfolgenden Tagen zu einem Anstieg der Präcancerosen auf 130% der DÄNA-Kontrolle. Dies entspricht einer Steigerung der Wirkdosis von 11,3% (siehe Tab. 16 und Abb. 26).

3.3 Einfluß der Behandlung mit DÄNA , Phenobarbital und DÄNA , sowie Halothan und DÄNA auf die Nitrosaminmetabolisierung und Alkylierungsintensität im mikrosomalen in vitro-System bei in vivo-Vorbehandlung mit DÄNA , Phenobarbital und Halothan .

Bei allen hier beschriebenen Kombinationsversuchen besteht eine kontroverse Beeinflussung des Initialschritts der DÄNA - Metabolisierung und der carcinogenen Wirksamkeit. Da in allen vorliegenden Untersuchungen über die Wirkung von Induktoren und Inhibitoren auf Gehalt und Funktion der nitrosaminmetabolisierenden Enzyme lediglich deren isolierter Effekt beschrieben wurde, war zu prüfen, ob unter den Bedingungen der in-vivo- Versuche bei gleichzeitiger Exposition der Wirkstoffe mit DÄNA die mikrosomalen Enzyme identisch beeinflusst werden.Nach 2 - bzw. 10 tägiger in vivo - Applikation von DÄNA, DÄNA- Phenobarbital und DÄNA- Halothan wurden die Gehalte der microsomalen Cytochrome P 450 und b 5 gemessen und im in vitro- System die Aktivität der Cytochrom P 450-Funktion durch Bestimmung der DMNA- Demethylierung und Nitroanisol- Demethylierung sowie der Alkylierungsrate microsomaler Proteine gemessen. Die Tiere waren zu Beginn der Applikation von 5 mg/kg KG DÄNA per Schlundsonde wie in 2.2.1 beschrieben mit Phenobarbital vorinduziert. Halothan wurde jeweils 1 Stunde lang vor der DÄNA - Behandlung nach 2.2.1 appliziert. Durch alleinige Vorbehandlung mit DÄNA wurden die gemessenen Funktionen nur wenig und uneinheitlich beeinflusst (siehe Tab. 17): Nach 2 Tagen war die Alkylierungsrate etwas erhöht, Gehalt und Funktion der Metabolisierungs-

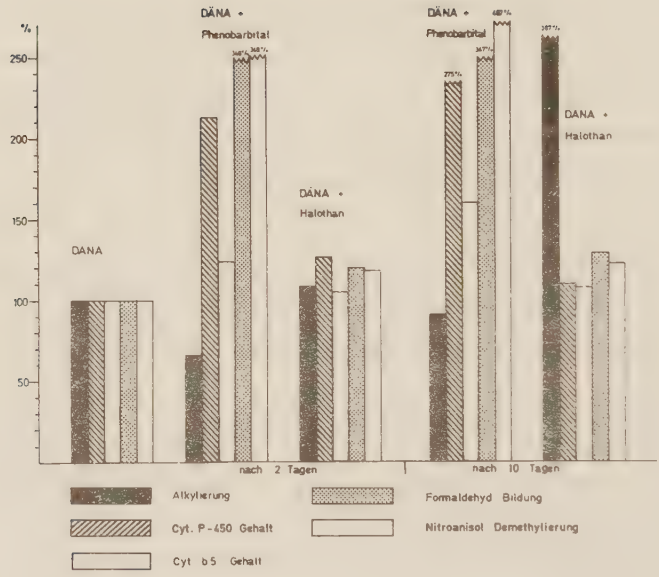


Abb. 27 : Alkylierung microsomaler Proteine durch DMNA, Cytochrom P 450 und -b 5 Gehalte, DMNA- und Nitroanisol-Demethylierung nach 2 und 10 tägiger DÄNA Applikation von 5 mg/kg KG pro Tag in Kombination mit Phenobarbital und Halothan .

enzyme gegenüber unbehandelten Tieren unbeeinflusst. Nach 10- tägiger DÄNA- Behandlung waren die Cytochromgehalte sowie DMNA- Demethylierung und Alkylierungsintensität ebenfalls wenig verändert. Bei simultaner Vorbehandlung mit Phenobarbital und DÄNA waren die Cytochrom P 450 und-b 5 Gehalte ähnlich stark erhöht wie unter alleiniger Phenobarbitalinduktion (siehe Abb. 27). Die Demethylierung von DMNA und Nitroanisol war entsprechend stark erhöht, die Alkylierungsintensität dagegen nach 2 und nach 10 Tagen gering erniedrigt. Bei kombinierter Einwirkung von DÄNA und Halothan waren zu beiden Zeitpunkten die Cytochromgehalte wenig verändert, die Demethylierung von DMNA und Nitroanisol nur nach 10-tägiger Applikation gering erhöht. Die Alkylierungsrate war nach 2-tägiger Halothanapplikation gering, nach 10 Tagen jedoch sehr deutlich gesteigert. Als empfindlicher Indikator der Diskrepanz zwischen Alkylierungsrate und microsomaler Aktivität ist der Quotient aus Alkylierung und Formaldehydbildung unter kombinierter DÄNA-Phenobarbital- Exposition zu beiden untersuchten Zeitpunkten bei voller Phenobarbitalinduktion deutlich erniedrigt, bei kombinierter DÄNA- Halothan - Einwirkung nach 10 Tagen , zum Zeitpunkt der voll ausgeprägten Halothanwirkung stark erhöht. Die Analysen haben demnach keine grundlegenden Unterschiede der Wirkung von Phenobarbital und Halothan bei simultaner Behandlung mit DÄNA erkennen lassen.

4. DISKUSSION

4.1 Zur Analyse der DÄNA-Wirkungskinetik

Nach dem einleitend dargestellten allgemein akzeptierten Reaktionsmechanismus (Abb. 1) ist die oxidative Dealkylierung von DMNA bzw. DÄNA durch eine Cytochrom P 450-abhängige Hydroxylierung der essentielle Schritt, der zur Bildung der reaktiven alkylierenden Metaboliten führt. Die Aktivierung dieser Reaktion durch Induktoren der Cytochrom P 450-Funktion sollte demnach zu einer gesteigerten Tumorinzidenz führen, eine Hemmung durch Inhibitoren ließe eine verminderte cancerogene Aktivität der Nitrosamine erwarten. Übereinstimmend mit dieser Vorstellung haben Czygan et al. 1973, Greim 1974 und Bartsch 1975 gezeigt, daß die Intensität der oxidativen Demethylierung von DMNA, stimuliert durch Induktion mit Phenobarbital und polychlorierten Diphenylen sowie gehemmt durch Einleiten von CO-Gas, mit der Mutationsrate im bakteriellen Testsystem korreliert. In Cancerisierungsversuchen mit Mäusen wurden jedoch bei simultaner Applikation von Diäthylnitrosamin mit Phenobarbital signifikant erniedrigte Tumorraten gefunden (Kunz et al., 1969). Durch Kombination von DÄNA mit Halothan, welches die Cytochrom P 450-Funktion hemmt, waren Tumorrate und -lokalisation wenig verändert. Interessanterweise kam es jedoch zu einer starken Vermehrung hepatozellulärer Carcinome bei gleichzeitiger Abnahme von Hämangioendotheliomen. Diese Diskrepanz zwischen theoretisch erwarteter und experimentell gefundener Tumorinzidenz war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Diese Interferenzerscheinungen der erwähnten Substanzen können auf einer Beeinflussung aller Schritte der Cancerogenese beruhen, weil die Stoffe die Carcinogenmetabolisierung, den generativen Stoffwechsel des Target-Gewebes, Repairmechanismen und die Proliferation transformierten Gewebes beeinflussen könnten. Da die Bestimmung der Tumoren keine Rückschlüsse auf den Cancerisierungsverlauf zuläßt, wurde versucht, durch quantitative Erfassung präneoplastischer Frühveränderungen während des ganzen Cancerisierungsverlaufs Hinweise auf die für den Effekt maßgebende Beeinflussung dieser Einzelfaktoren zu erhalten. In ausgedehnten Grundlagenuntersuchungen wurde geprüft, ob sich dazu die quantitative Erfassung der schon in sehr frühen Cancerisierungsstadien nachweisbaren Enzymausfälle eignet. Nach Weber & Cantero (1955) sowie Morris & Pitot (1961) finden sich in Lebercarcinomen regellose Ausfälle zahlreicher Enzyme, besonders der Glucose-6-Phosphatase. Sie lassen sich schon in sehr frühen Cancerisierungsstadien nachweisen und besitzen sicher keine kausale Bedeutung für die carcinogene Transformation, sondern sind Folgen somatischer Mutationen, die trefferstatistisch mit Intensität und Dosis des Carcinogens korrelieren. Deshalb ist es denkbar, daß es zu einem Ausfall eines Enzyms kommt, ohne daß die Zelle durch einen gleichzeitigen Treffer im wachstumsregulierenden Genort transformiert wird. Im Gegensatz zur toxisch reversiblen Enzymverminderung würde eine solche Zelle den Enzymdefekt bis zum Zelltod beibehalten. Umgekehrt ist aber auch eine Transformation zur präcancerösen Zelle oder Tumorzelle ohne eine Störung der Synthese des untersuchten Enzyms, bzw. mit dem Ausfall eines anderen Enzyms, denkbar. Ausgehend von diesen

Überlegungen wurde zunächst versucht, durch methodisch einfache Bestimmung mutationsbedingter Enzymausfälle im Leberhomogenat Frühveränderungen der Carcinogenexposition nachzuweisen. Das war allerdings nur andeutungsweise und mit begrenzter Aussagekraft möglich. Obwohl die Glucose-6-Phosphatase-Gehalte sämtlicher behandelter Tiere gegenüber denjenigen der unbehandelten Gruppen schon früh erniedrigt waren, konnte eine weitere Abnahme der Aktivität mit zunehmender Behandlungszeit nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist dies auf kompensatorisch vermehrte Glucose-6-Phosphatase oder durch von Bannasch nachgewiesene Areale mit Glucose-6-Phosphatase-Erhöhung zurückzuführen. Demgegenüber lassen sich durch die von Chiquoine 1955 entwickelten und von Wachstein & Meißel 1956 verbesserten enzymhistochemischen Nachweisreaktionen schon kleine enzymfreie Areale erkennen und die Anzahl, Lokalisation,Einzelgröße und damit die Gesamtheit der Enzymdefekte bestimmen. Schon nach kurzer Expositionszeit mit minimalen Carcinogenkonzentrationen lassen sich auf diese Weise Ausfälle der Glucose-6-Phosphatase und ATPase nachweisen und aufgrund ihrer Verteilung und Anlage eindeutig von toxischen Defekten abgrenzen und der carcinogenen Wirkung zuordnen. Erstmals wurde der enzymhistochemische Nachweis Glucose-6-Phosphatasefreier präcanceröser Zellareale 1964 von Goessner & Friedrich-Freksa geführt. Schauer & Kunze beschrieben 1968 den ATPase-Defekt der Präcancerosen. Diese Methoden erlauben eine objektive und quantitative Erfassung von Frühwirkungen hepatozellulärer Carcinogene und bieten damit als entscheidenden Vorteil gegenüber den bisher gebräuchlichen Kriterien der

carcinogenen Spätwirkungen wie Tumorzahl, Tumortastbefund oder Tumortod die Möglichkeit einer frühzeitigen und kontinuierlichen Erfassung des Cancerisierungsverlaufs. Sie scheinen sich damit als Screening-Methoden zur Überprüfung hepatocarcinogener Substanzen zu eignen. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit machte es notwendig, die bisher nur unzureichend charakterisierten Dosis-Wirkungs-Beziehungen der präneoplastischen Veränderungen eingehend zu untersuchen. Aus erwähnten Gründen fand hierbei die Bestimmung ATPase-freier Areale als Parameter der DÄNA-Carcinogenwirkung Verwendung. Unabhängig von der Dosierung fand sich unter Durchfütterungsbedingungen für alle drei gemessenen Größen, der Summe aller Enzymdefekte bezogen auf das untersuchte Gesamtgewebe, der Zahl der Enzymausfälle pro Quadratzentimeter und der gemittelten Fläche der enzymfreien Areale,ein lineares Anwachsen im doppelt logarithmischen System. Überraschend war der logarithmische Anstieg der Zahl enzymdefekter Areale, wäre doch hier in der Annahme einer quantitativ gleichen Wirkung jeder einzelnen Carcinogendosis als Ausdruck der Summationswirkung ein einfach linearer Anstieg zu erwarten. Eine Erklärung der offensichtlich stärkeren Wirkung einer späteren gegenüber der zu einem früheren Zeitpunkt in gleicher Höhe verabreichten Carcinogendosis bietet die Mehrtreffertheorie. Demnach sind zur Transformierung der Normalzelle in eine enzymdefekte präcanceröse Zelle mehrere Schritte notwendig. Die Entstehung inkomplett transformierter Zellen, bei denen nur ein Teil der zur vollständigen Transformation notwendigen Treffer nach unzureichender Carcinogeneinwirkung erreicht wurde, erscheint daher möglich. Solche

latent vorgeschädigte Zellen können durch weitere Carcinogeneinwirkung komplett transformiert werden. Auf einen Mehrtreffervorgang der DÄNA-Carcinogenwirkung wies auch Druckrey 1963 hin, der ihn aus der ungewöhnlich geringen Streuung der zum Tumornachweis benötigten Zeiten unter Durchfütterung von DÄNA ableitete. Für verschiedene Tagesdosen fand Druckrey denselben Verteilungstyp der jeweils bis zum Tumornachweis bzw. bis zum Tumortod erforderlichen Zeiten und somit gleiche Steigungen im Wahrscheinlichkeitsnetz, woraus er für alle DÄNA-Dosierungen denselben Wirkungsmechanismus ableitete. In diesem Zusammenhang war es wichtig zu wissen, ob der Wirkungsmechanismus von DÄNA, welcher zu den enzymdefekten Präcancerosen führt, mit demjenigen der DÄNA-Carcinogenese identisch ist. Daher war zu prüfen, ob die für die DÄNA-Carcinogenese zutreffenden Gesetzmäßigkeiten auch für die Entwicklung von Präcancerosen gelten. In Cancerisierungsversuchen fanden Druckrey et al. eine Abhängigkeit der zum Auftreten eines definierten Tumorstadiums, des tastbaren Tumors bzw. des Tumortodes benötigten Zeit t von der täglich applizierten DÄNA-Dosis d:
$d \times t^{2,3}$ = konstant. Als das entsprechende Kriterium der präcancerösen Veränderungen wurde das Erreichen einer definierten Gesamtfläche enzymfreien Gewebes gewählt (z.B. 1%). In Durchfütterungsversuchen mit verschiedenen Tagesdosen konnte diese definierte präcanceröse Fläche wegen der parallelen Zellwirkungsverläufe nach Abb.11 für jeden beliebigen Meßpunkt graphisch abgeleitet oder errechnet werden. Die Parallelität der damit gefundenen Dosis-Zeit-Beziehung für Präcancerosen

zu der Dosis-Zeit-Abhängigkeit für Tumoren im doppelt logarithmischen System beweist die Gültigkeit von $d \times t^{2,3} =$ konstant auch für Carcinomvorstufen. Diese Übereinstimmung erhärtet die bislang unbewiesene gesetzmäßige Verbindung der Carcinomentstehung mit der Entwicklung von Enzymdefekten.Es ist deshalb erlaubt,aus dem Ausmaß präneoplastischer Veränderungen quantitative Folgerungen für die carcinogene Wirksamkeit abzuleiten.Von besonderer Wichtigkeit ist dies für die Beurteilung sehr kleiner carcinogener Dosen,die innerhalb der Lebenszeit der Tiere nicht mehr zur Tumormanifestation führen. Die experimentell und unter Durchfütterungsbedingungen gefundenen Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen $F = t^{4,9} \times K_f$, $d \times t^{2,3} = K_d$ und $F = d^{2,1} \times K_t$ sowie zusammengefaßt $d \times t^{2,3} = F^{\frac{1}{2,3}} \times 8500 \frac{mg \times Tage}{kg\ KG \times \%}$ der DÄNA-Carcinogenese beschreiben in den untersuchten Dosis- , Zeit- und Wirkungsbereichen die wechselseitigen Abhängigkeiten der 3 Variablen Gesamtinselfläche, Dosis und Zeit. Hieraus läßt sich jede der drei Größen ableiten, sofern zwei davon bekannt sind, was besondere Bedeutung hat für Versuchsbedingungen mit unbekannter Wirkdosis bei veränderter Stoffwechsellage oder Resorption, wenn Expositionsdauer und Inselfläche bekannt sind. Nach zeitlich begrenzter DÄNA-Einwirkung steigt die prozentuale Gesamtinselfläche dosisunabhängig im doppelt logarithmischen System weiter an. Der Anstiegswinkel von 59° entspricht annähernd demjenigen des mittleren Inselwachstums unter Durchfütterungsbedingungen mit einem Winkel von 61°,woraus sich die Zeit-Wirkungsbeziehung $F = t^{1,66} \times K_a$ nach abgeschlossener DÄNA-Exposition ableiten läßt.

Die nach Absetzen des Carcinogens nur in den ersten Wochen weiter ansteigende Gesamtinselfläche ist vorwiegend durch eine weitere Zunahme der Inselzahl bedingt. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß heterocygote Enzymdefekte bzw. Treffer wachstumsregulatorische Funktionen erst nach mitotischer Teilung der Zelle homocygot und damit manifest werden. Erstaunlicherweise sinkt die Inselzahl bei niedriger DÄNA-Dosierung wieder ab und erreicht dann ein gleichbleibendes Niveau. Der Grund für diesen Verlauf liegt möglicherweise in der physiologischen Eliminierung von enzymdefekten, jedoch nicht gleichzeitig transformierten Zellarealen. Dafür spricht, daß die Zeit bis zum Erreichen des steady state der physiologischen Lebensdauer einer Leberzelle entspricht (Bucher, 1967). Wegen der Inselzahlkonstanz in der steady state-Phase steigt die Gesamtinselfläche wie die mittlere Einzelinselfläche nach $F = t^{1,66} \times K_a$ an. Aus dieser Zeit-Wirkungsbeziehung läßt sich auch bei Stoppversuchen bei bekanntem behandlungsfreiem Intervall die Gesamtinselfläche der Enzymdefekte zu Behandlungsende und daraus unter Verwendung der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen für Durchfütterungsbedingungen bei gegebener Expositionszeit die carcinogene DÄNA-Wirkdosis errechnen.
Zusammenfassend kann mit den gefundenen Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehungen für Durchfütterungsbedingungen bei bekannter behandlungsfreier Latenzzeit der Cancerisierungsverlauf in allen Stadien verfolgt werden.

4.2 Zur Beeinflussung der DÄNA-Carcinogenese durch Induktoren und Inhibitoren der oxidativen Hydroxylierung

In Präcancerosenstudien mit den genannten und weiteren, die Cytochrom P-450-Funktion modifizierenden Substanzen, konnten die Resultate der Cancerisierungsversuche bestätigt und quantifiziert werden.

Unter Phenobarbital und DÄNA waren die Präcancerosen bei verschiedenen Dosierungen auf ca. 50% der DÄNA-Vergleichsgruppe erniedrigt. Übereinstimmend mit der in Cancerisierungsversuchen um 20% erhöhten Überlebenszeit unter Phenobarbital kam es bei den Präcancerosen zu einer zeitlichen Wirkungsverzögerung um 17%. Als zusätzliche Erkenntnis konnte nach 3.1.4 die Reduktion der eingesetzten DÄNA-Dosis um 30% errechnet werden. Offensichtlich enthält das durch Phenobarbital induzierte Monoxygenasesystem Komponenten mit entgiftender Wirkung. Demnach wäre die Dosisverminderung um ca. 65% unter kombinierter Phenobarbital- und DÄNA-Applikation in verschiedenen Dosierungen im Trinkwasser damit zu erklären, daß das kontinuierlich anfallende Carcinogen von dem aktivierten Metabolisierungssystem besser entgiftet werden kann als eine die Metabolisierungsenzyme überflutende DÄNA-Dosis nach Injektion in den Magen bzw. intraperitoneal. Das Fehlen bzw. das extrem verminderte Auftreten von Enzymdefekten unter Einwirkung von 0,1 mg/kg KG DÄNA auf Phenobarbital-induzierte Ratten zeigt, daß hier die Schwelle der Nachweisbarkeit einer DÄNA-Wirkung erreicht ist. Ob diese auf eine völlige Entgiftung des Carcinogens zurückzuführen ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Dies würde bedeuten, daß eine carcinogene Wirkung erst nach Überschreiten einer von der Stoffwechselaktivität abhängigen Schwellendosis erreicht wird. Um zu überprüfen, ob der Phenobarbitaleinfluß auf die Veränderung der initialen DÄNA-Wirkung beschränkt ist, oder ob die Weiterentwicklung bereits induzierter Präcancerosen ebenfalls beeinflußt wird, wurden diese nach abgeschlossener DÄNA-Applikation unter Phenobarbitaleinwirkung untersucht. Da Phenobarbital durch Steigerung der Mitoserate und des Zellvolumens der Hepatocyten zu einer Vergrößerung der Leber führt, war wie bei anderen proliferationsfördernden Reizen, z.B. chronischen Entzündungen oder Teilhepatektomien, ein vermehrtes Inselaufkommen zu erwarten. Dieses ist nach den Befunden von 3.2.2 auf eine Zunahme der Inselzahl zurückzuführen und stimmt überein mit Untersuchungen von Nishizumi (1976), bei denen Phenobarbital lediglich zu einer Vergrößerung der Tumorzahl, nicht aber der Tumorgröße führten. Die Möglichkeit der Phenobarbitalwirkung über eine Immunsuppression konnte von Weisburger et al. (1975) weitgehend ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist es, die Tumorpromotion auf die beschleunigte Teilungsrate zurückzuführen, wodurch heterocygote, latente Enzymdefekte schneller homocygot und damit manifest werden.
Der exakte Wirkungsmechanismus, der zu einer Verminderung der Nitrosaminwirkung bei simultaner Applikation führt, läßt sich noch nicht sicher beurteilen. Es gilt jedoch als gesichert, daß hierfür die gesteigerte Aktivität des mikrosomalen Oxygenasesystems verantwortlich ist. Induktion von

Cytochrom P-448 durch 3-Methylcholanthren bewirkt in Übereinstimmung mit Phenobarbital eine Verminderung der DÄNA-Wirkung. Die Cytochrom P-450-Inhibitoren SKF 525 A, Metyrapon und Halothan führen zu einer erhöhten carcinogenen Wirksamkeit. Alle in vivo-Versuche mit Induktoren bzw. Inhibitoren der Mikrosomenfunktion zur Klärung der Abhängigkeit der DÄNA-Wirkung vom DÄNA-Metabolismus zeigten demnach übereinstimmend eine zu dem postulierten Aktivierungsmechanismus von DÄNA kontroverse Beeinflussung seiner Wirksamkeit. Dieses zunächst sehr unwahrscheinliche Verhalten könnte dadurch bedingt sein, daß bei den Untersuchungen dieser Arbeit die Effektoren der Mikrosomenfunktion nicht isoliert, sondern immer in Kombination mit DÄNA appliziert wurden. Die Untersuchung der Beeinflussung von Cytochromgehalten und -funktion sowie der Alkylierung mikrosomaler Proteine durch DMNA unter diesen Bedingungen, zeigte jedoch keine grundlegenden Unterschiede gegenüber der alleinigen Anwendung der Effektoren mikrosomaler Funktionen. Unspezifische Faktoren wie eine veränderte Nitrosaminmembranpermeation oder eine Verschiebung der Alkylierungskinetik konnte in vorausgegangenen Untersuchungen ausgeschlossen werden. Die Diskrepanz zwischen erwarteter und gefundener Beeinflussung der Nitrosaminwirkung könnte darauf zurückzuführen sein, daß unter Induktion mikrosomaler Metabolisierung mit Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums alkylierende Metaboliten bereits im extranukleären Raum entstehen und dort aufgrund ihrer hohen Affinität zu verschiedenen Makromolekülen abgefangen werden, ohne in den Kern zu gelangen.

Umgekehrt kämen die Nitrosamine bei gehemmter mikrosomaler Aktivität vermehrt im Kernbereich zur Wirkung. Bei dieser Kompartimentierung der Carcinogenwirkung wäre eine gleichsinnige Beeinflussung der mikrosomalen Aktivität und der Alkylierung mikrosomaler Proteine durch Nitrosamine zu erwarten. Im Experiment konnte dies nicht bestätigt werden. Die Alkylierung nukleärer und extranukleärer Makromoleküle wurde durch Induktoren bzw. Inhibitoren der Metabolisierungsenzyme in gleicher Weise beeinflußt (Appel, 1976), wofür die gleichartige Aktivitätsveränderung mikrosomaler sowie in der äußeren Kernmembran lokalisierter Nitrosamin-metabolisierender Enzyme verantwortlich gemacht wird (Salzmann, 1977). Möglicherweise ist das Absinken der Alkylierungsrate unter Einwirkung eines induzierten Cytochrom P-450-Systems Ausdruck einer konkurrierenden Entgiftungsaktivität des Cytochrom P-450. Mögliches Substrat einer entgiftenden Reaktion ist das Monoalkyl-Diazohydroxyd, welches nach oxidativer, Cytochrom P-450-abhängiger Dealkylierung aus Dialkylnitrosamin entsteht (siehe Einleitung). Dieses ist sehr instabil und zerfällt spontan unter Aufnahme eines Protons in einen kationischen Alkylrest, N_2 und H_2O. Im alkalischen Milieu zeigt das Alkyl-Diazohydroxyd jedoch eine gewisse Stabilität, welche Voraussetzung für eine weitere enzymatische Umwandlung ist. Unter physiologischen Verhältnissen ist dies im aprotischen Milieu der Lipidmembranen denkbar. Eine oxidative Dealkylierung von Alkyl-Diazohydroxyd und damit die Entgiftung von Dialkylnitrosamin durch sequentielle Dealkylierung scheint als Alternative zum Zerfall

in alkylierende Agenzien möglich. Nach dieser Hypothese wäre die verminderte Tumorinzidenz und Alkylierungsrate unter Cytochrom P-450-Induktion durch eine Entgiftung auf der Stufe des Diazohydroxyds in Konkurrenz mit dem spontanen Zerfall erklärt. Unter Einwirkung von Inhibitoren könnte umgekehrt eine verminderte oxidative Dealkylierung der zweiten Alkylgruppe ausschlaggebend für die gesteigerte Alkylierungsrate und Tumorinzidenz sein. Für die prinzipielle Möglichkeit einer sequentiellen Dealkylierung bestehen experimentelle Hinweise (Appel, 1976). Als eine weitere Möglichkeit zur Deutung der Befunde ist zu diskutieren, daß Alkylnitrosamine durch differente Cytochrom P-450-Spezies metabolisiert werden. Hinweise dafür ergaben Untersuchungen von Argos et al. (1977). Sie nehmen an, daß es eine Cytochrom P-450-Spezies mit hoher Affinität und niedriger Umsatzgeschwindigkeit und eine zweite Spezies mit geringer Affinität und hoher Umsatzgeschwindigkeit gibt. Sie postulieren, daß Phenobarbital und 3-Methylcholanthren vorwiegend die erstgenannte Spezies induzieren und dadurch die Nitrosaminaktivierung verlangsamen. Diese Hypothese würde zwar die Wirkung der Induktoren erklären, nicht aber diejenige von SKF 525 A, Metyrapon und Halothan.

Die in Interferenzversuchen nachgewiesene Beeinflussung der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin durch Pharmaka und Fremdstoffe besitzt möglicherweise praktische Bedeutung für die Chemocarcinogenese des Menschen. In Untersuchungen der Krebsmorbidität bei Patienten, welche unter

langzeitiger Behandlung mit Antiepileptika , Antidiabetika und anderen induzierenden Pharmaka standen, konnten mit den tierexperimentellen Befunden übereinstimmende Ergebnisse gefunden werden. Bei der Überprüfung hepatocarcinogener, in der menschlichen Umwelt vorkommender Substanzen und der Beeinflussung ihrer Wirkung durch Fremdstoffe, ist der Präcancerosennachweis mittels ATPase-Defekten eine geeignete Methode, Frühveränderungen der Hepatocarcinogenese zu erfassen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Nach dem allgemein akzeptierten Mechanismus der Nitrosaminaktivierung besteht der Initialschritt in einer Cytochrom P 450-abhängigen oxidativen Dealkylierung. Demnach wäre bei Induktion der mikrosomalen Monoxygenase eine gesteigerte, bei deren Inhibition eine verminderte Carcinogenwirkung zu erwarten. Tierexperimentelle Cancerisierungsversuche ergaben jedoch entgegengesetzte Resultate. Die Aufklärung dieser Diskrepanz war Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Dazu wurde weiblichen Wistarratten Diäthylnitrosamin mit der Schlundsonde in verschiedenen Dosierungen appliziert oder bei langdauernden Applikationszeiten mit dem Trinkwasser zugeführt. Als Induktoren wurden Phenobarbital und Methylcholanthren, als Inhibitoren SKF 525 A, Metyrapon, Halothan und Kobaltchlorid eingesetzt. Bestimmt wurde die Beeinflussung von Cytochrom P 450- und - b 5-Gehalten und Funktion, die Nitroanisoldemethylierung sowie die oxidative Demethylierung und die Alkylierungsintensität von ^{14}C-DMNA. Zur Beurteilung der durch Induktoren und Inhibitoren veränderten DÄNA-Carcinogenität wurde während des Cancerisierungsverlaufs das Ausmaß präneoplastischer Veränderungen durch die histochemische Darstellung ATPase-freier Areale ermittelt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Unter kontinuierlicher DÄNA-Applikation stiegen die Gesamtfläche, die Zahl und die mittlere Fläche enzymfreier Areale dosisunabhängig mit der Zeit linear im doppelt logarithmischen Netz an und folgen damit dosisunabhänigen Gesetz-

mäßigkeiten. Aus ihnen ließ sich die Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung $d \times t^{2,3} = F^{\frac{1}{2,1}} \times K$ der DÄNA-Carcinogenese für Durchfütterungsbedingungen ableiten. Für die Entwicklung präneoplastischer Veränderungen gelten demnach die gleichen quantitativen Gesetzmäßigkeiten, die von Druckrey für die Tumorentstehung nachgewiesen wurden. Es ist deshalb erlaubt, aus der Größe der präneoplastischen Veränderungen quantitative Rückschlüsse auf die Tumorbildung zu ziehen. Dies ist von besonderer Bedeutung für den Nachweis der präcarcinogenen Wirksamkeit sehr niedriger,innerhalb der Lebenszeit der Tiere nicht zum Tumor führender Carcinogendosen. Es ergeben sich dadurch Möglichkeiten zur Beurteilung des Problems der carcinogenen Wirkschwelle.

2. Nach Beendigung der DÄNA-Exposition nahm die Gesamtfläche und mittlere Fläche enzymfreier Areale wiederum dosisunabhängig linear im doppelt logarithmischen System zu und zwar mit der Steigung der mittleren Einzelinselfläche unter Durchfütterungsbedingungen, während die Inselzahl nach einer dosisabhängigen Übergangsphase von wenigen Wochen konstant blieb.
3. Die simultane Applikation von DÄNA und dem Induktor der mikrosomalen Metabolisierung,Phenobarbital, führte in keinem Fall zu einer Änderung der oben beschriebenen Gesetzmäßigkeiten. Die Zeit-Wirkungs-Verläufe von Gesamtinselfläche und Inselzahl waren zu denjenigen der DÄNA-Vergleichsgruppen parallel nach unten verschoben. Die daraus abzuleitende Reduktion der DÄNA-Wirkdosis ließ sich nach den gefundenen Gesetzmäßigkeiten errechnen.

Das Ausmaß der Dosisreduktion betrug in Abhängigkeit von der Applikationsart und Dosierung 30 bzw. 64 %.

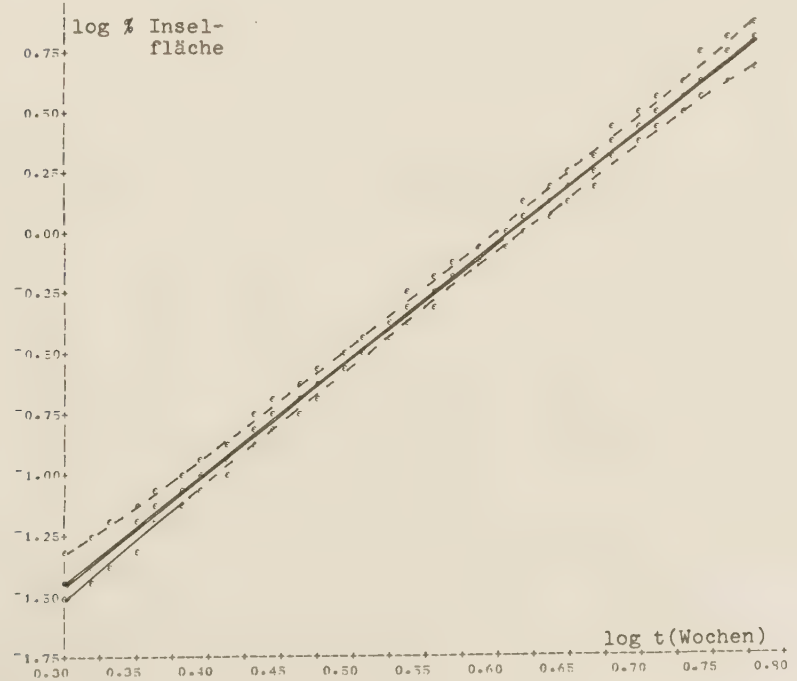
4. Eine qualitativ und quantitativ gleiche Beeinflussung der DÄNA-Wirkdosis wurde unter Methylcholanthren, einem Induktor des Cytochrom P 448, gefunden. Inhibitoren der mikrosomalen Metabolisierung wie SKF 525 A, Metyrapon, Halothan und in geringerem Maße Kobaltchlorid führten umgekehrt zu einer Steigerung der DÄNA-Wirkdosis.
5. Bei der Untersuchung des Phenobarbitaleinflusses auf bestehende, DÄNA-induzierte präneoplastische Areale wurde eine promovierende Wirkung von Phenobarbital auf die Inselzahl beobachtet, während die Wachstumsintensität der Einzelinseln unbeeinflußt blieb.
6. Die Untersuchung der Wirkung einer simultanen Applikation von DÄNA und Phenobarbital bzw. DÄNA und Halothan ergab keine grundlegenden Unterschiede gegenüber der isolierten Wirkung der Effektoren Phenobarbital und Halothan auf Cytochrom-Gehalte, mikrosomale Funktionen und Alkylierung von Proteinen durch DMNA.
7. Mögliche Ursachen der zur postulierten metabolischen Aktivierung von DÄNA kontroversen Befunde wurden diskutiert.

6 . TABELLARISCHER ANHANG

Jeder Meßwert der histochemischen Untersuchungen wurde aus 3 in verschiedenen Schnittebenen derselben Leber gemessenen Werten gemittelt .

Parameter der linearen Regression und Vertrauensbereich für das Signifikanzniveau a = 0,05 für die Gesamtinselflächen der Versuchsgruppen mit kontinuierlicher DÄNA-Applikation : (Versuch Nr. 3.1.2. und 3.1.4. , Tabellen 3 und 4).

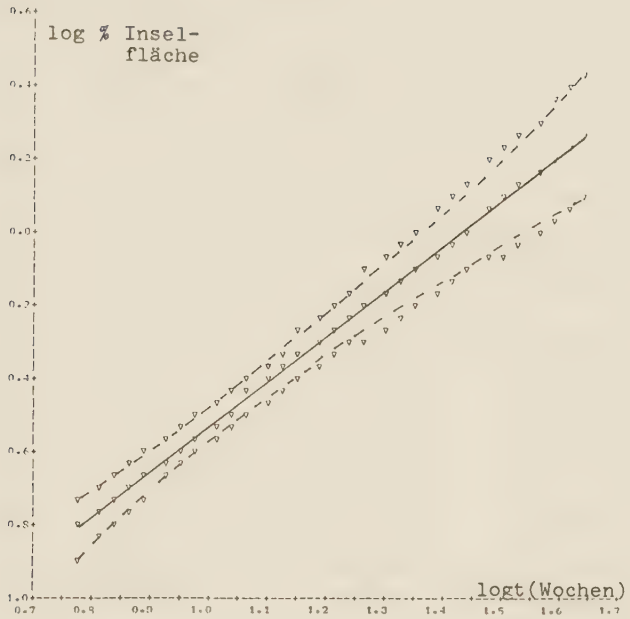
Tier-gruppe	Tier-zahl	Regressions-konstante	Regressions-koeffizient	Anstiegs-winkel	Korrelations-koeffizient
D 5mg	15	-3,057	4,861	78,4°	0,95
DPh5mg	15	-3,153	4,574	77,7°	0,97
D 2mg	8	-3,065	3,871	75,5°	0,94
D 4mg	8	-2,551	4,070	76,2°	0,92
D 6mg	8	-1,951	3,505	74,1°	0,97
D 8mg	8	-2,752	5,668	80,0°	0,98
D10mg	7	-2,384	5,375	79,5°	0,98
Regression innerhalb		-2,835	4,644	77,8°	0,96



Wie ersichtlich ergaben sich für die Linaerität der Regressionen bei allen Versuchsreihen hohe positive Korrelationen. Die Anstiegswinkel der berechneten Geraden liegen zwischen 74° und 80°.Zwischen den Regressionskoeffizienten der einzelnen Geraden ist auf dem 5%-Niveau kein Unterschied nachweisbar. Damit ist die Annahme möglich, daß alle Versuchsgruppen für den Anstiegswinkel der Regressionsgeraden einen gemeinsamen wahren Wert haben. Der Schätzwert für diesen gemeinsamen Anstiegswinkel (in der Tabelle "Regression innerhalb") beträgt 77,8°. Das 95% Konfidenzintervall hierzu reicht von 77,0° bis 78,7°.

Parameter der linearen Regression und Vertrauensbereich für das Signifikanzniveau a = 0,05 für die Gesamtinselflächen derjenigen Versuchsgruppen,die in unterschiedlichen Zeitabständen nach abgeschlossener DÄNA-Behandlung untersucht wurden. (Versuch Nr.3.1.6., Tabellen 5, 6 und 7).

Tiergruppe	Tierzahl	Regressionskonstante	Regressionskoeffizient	Anstiegswinkel	Korrelationskoeffizient
D 5mg	24	-1,865	1,325	52,9°	0,60
DPh5mg	24	-2,136	1,460	55,6°	0,67
DPH5mg	24	-1,853	1,574	57,5°	0,66
D 1mg	9	-1,958	1,182	49,8°	0,84
D 4mg	20	-1,409	0,894	41,7°	0,70
Regression innerhalb		-1,769	1,238	51,0°	0,68



Für die Zunahme der Gesamtinselfläche in der Phase des autonomen Wachstums nach Absetzen des Carcinigens ergibt sich eine ebenfalls positive Korrelation für die Linearität der Regressionen, wenn auch weniger ausgeprägt als bei den Durchfütterungsversuchen.Die Ursache hierfür liegt in der dosisabhängig unterschiedlichen Zeitspanne, die zum Erreichen der steady-state-Phase benötigt wird . Aus dem gleichen Grund erhält man auch eine größere Streuung der Regressionskoeffizienten innerhalb der Versuchsreihen .

Tab. 3: Durchfütterung von 5 mg/kg KG DÄNA (D) und DÄNA + Phenobarbital (DPh) mit Gesamtdosen von 60-180 mg/kg KG DÄNA. Jeder Wert wurde aus 3 in verschiedenen Schnittebenen derselben Leber gemessenen Werte gemittelt.

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel x 10^{-2}
D_1 (2)	0,1020	36,6389	0,2835
D_2 (2)	0,0128	9,1296	0,1408
D_3 (2)	0,0238	14,1760	0,1673
MW	0,0462	19,9815	0,1972
DPh_1 (2)	0,0535	16,8426	0,3189
DPh_2 (2)	0,0137	7,9166	0,1935
DPh_3 (2)	0,0108	3,2769	0,3161
MW	0,0260	9,3454	0,2762
D_1 (3)	0,0929	18,78	0,4946
D_2 (3)	0,3463	54,49	0,6092
D_3 (3)	0,1600	46,74	0,3436
MW	0,1997	40,00	0,4823
DPh_1 (3)	0,1456	45,98	0,3217
DPh_2 (3)	0,0645	13,63	0,5063
DPh_3 (3)	0,0786	19,93	0,3967
MW	0,0962	26,51	0,4082

D_1 (4)	0,6963	96,02	0,7255
D_2 (4)	0,399	110,65	0,3627
D_3 (4)	0,335	60,185	0,5575
MW	0,4768	88,951	0,5486
DPh_1 (4)	0,243	46,3889	0,5059
DPh_2 (4)	0,467	68,8889	0,6808
DPh_3 (4)	0,335	60,2778	0,5532
MW	0,345	58,519	0,5799
D_1 (5)	3,19	216,67	1,4772
D_2 (5)	1,20	149,08	0,8084
D_3 (5)	3,19	242,59	1,3234
MW	2,53	202,78	1,2030
DPh_1 (5)	0,768	140,28	0,5481
DPh_2 (5)	1,878	201,39	0,9322
DPh_3 (5)	0,868	116,48	0,7464
MW	1,17	152,72	0,7422
D_1 (6)	6,63	331,48	2,0033
D_2 (6)	7,4	409,72	1,8056
D_3 (6)	7,3	493,51	1,4749
MW	7,111	411,57	1,7612
DPh_1 (6)	4,5	302,78	1,5018
DPh_2 (6)	3,0	240,74	1,2652
DPh_3 (6)	2,18	217,59	0,9967
MW	3,23	253,70	1,2546

Tab. 4 : Durchfütterung von täglich 2-10 mg/kg KG DÄNA per Schlundsonde während 20 (D 20) bzw. 30 (D 30) Tagen.

2 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1(20)	0,061	18,73	0,362
D_2(20)	0,073	16,1	0,453
D_3(20)	0,056	9,8	0,571
D_4(20)	0,054	12,43	0,434
MW	0,061	14,26	0,4277
D_1(30)	0,147	32,55	0,4516
D_2(30)	0,29	42,0	0,6905
D_3(30)	0,362	60,03	0,603
D_4(30)	0,23	35,7	0,6443
MW	0,257	42,52	0,6044

4 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel x 10^{-2}
D_1(20)	0,168	31,15	0,5393
D_2(20)	0,26	57,23	0,4543
D_3(20)	0,26	61,08	0,5255
D_4(20)	0,321	62,3	0,3981
MW	0,249	52,93	0,4704

4 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(30)$	1,333	151,73	0,8785
$D_2(30)$	0,761	74,37	1,0233
$D_3(30)$	0,725	121,8	0,5952
$D_4(30)$	1,751	183,23	0,9556
MW	1,143	132,63	0,8618

6 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(20)$	0,447	73,85	0,6053
$D_2(20)$	0,65	75,25	0,8638
$D_3(20)$	0,60	80,5	0,7453
$D_4(20)$	0,415	69,3	0,5988
MW	0,528	74,72	0,7067
$D_1(30)$	1,602	184,28	0,8693
$D_2(30)$	1,90	175,0	1,0857
$D_3(30)$	2,306	181,47	1,2707
$D_4(30)$	1,70	127,75	1,3307
MW	1,877	167,12	1,1231

8 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(20)$	0,841	179,9	0,4674
$D_2(20)$	0,979	178,5	0,5484
$D_3(20)$	0,648	103,77	0,6244
$D_4(20)$	1,202	97,65	1,2309
MW	0,917	139,94	0,6552

8 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1(3o)	6,222	351,57	1,7698
D_2(30)	5,62	252,0	2,2302
D_3(30)	8,63	357,0	2,4174
D_4(30)	7,46	337,75	2,2087
MW	6,984	324,62	2,1514

10 mg/kg KG DÄNA

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1(20)	1,23	91,0	1,3516
D_2(20)	2,44	123,24	1,9799
D_3(20)	1,28	108,5	1,1797
D_4(20)	1,37	116,02	1,1808
MW	1,35	109,7	1,2306
D_1(30)	11,17	477,75	2,3380
D_2(30)	10,45	411,25	2,5410
D_3(30)	9,88	423,5	2,3329
MW	10,50	437,5	2,400

Tab. 5 : 3-wöchige Behandlung mit 5 mg/kg KG DÄNA per Schlundsonde (D) , DÄNA und Phenobarbital simultan (DPh) und Phenobarbital im Anschluß an die DÄNA-Exposition (DPH) . Untersuchungstermine sofort, 4, 6, 8, 10, 12 und 16 Wochen nach Beendigung der DÄNA-Behandlung .

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel x 10^{-2}
$D_1(0)$	0,0399	14,6945	0,2763
$D_2(0)$	0,01844	4,0167	0,4600
$D_3(0)$	0,01068	1,975	0,5400
$D_4(0)$	0,0241	9,4805	0,2536
$D_5(0)$	0,0242	3,5917	0,7400
MW	0,02346	6,7517	0,4540
$DPh_1(0)$	0,01862	4,0639	0,3600
$DPh_2(0)$	0,00897	2,8528	0,2999
$DPh_3(0)$	0,04732	10,5972	0,44398
$DPh_4(0)$	0,01872	6,0083	0,29714
$DPh_5(0)$	0,01796	4,4528	0,3000
MW	0,0-232	5,5950	0,3402
$D_1(4)$	0,1922	30,750	0,6173
$D_2(4)$	0,0569	8,747	0,8132
$D_3(4)$	0,0297	9,014	0,3260
$D_4(4)$	0,1159	15,122	0,7567
$D_5(4)$	0,0516	9,464	0,5749
MW	0,0893	14,619	0,6176

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$DPh_1(4)$	0,0565	11,869	0,5751
$DPh_2(4)$	0,0353	9,263	0,3733
$DPh_3(4)$	0,1182	22,744	0,5082
$DPh_4(4)$	0,1391	20,022	0,7481
$DPh_5(4)$	0,0313	7,217	0,4286
MW	0,0761	14,223	0,5267
$DPH_1(4)$	0,1714	27,336	0,6617
$DPH_2(4)$	0,1650	27,416	0,6225
$DPH_3(4)$	0,2035	25,594	0,7881
$DPH_4(4)$	0,1465	25,647	0,5588
MW	0,1716	26,500	0,6578
$D_1(6)$	0,0663	10,056	0,6400
$D_2(6)$	0,0593	8,361	0,7440
$D_3(6)$	0,1299	16,833	0,7367
$D_4(6)$	0,3409	44,972	0,7579
$D_5(6)$	0,2302	40,222	0,5747
MW	0,1653	24,088	0,6906
$DPh_1(6)$	0,1940	27,594	0,7229
$DPh_2(6)$	0,1918	21,763	0,8752
$DPh_3(6)$	0,0829	14,378	0,5691
$DPh_4(6)$	0,0451	6,686	0,6759
$DPh_5(6)$	0,0665	9,822	0,7679
MW	0,1161	16,048	0,7222

Tier	%Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$DPH_1(6)$	0,2407	28,583	0,8594
$DPH_2(6)$	0,4526	60,361	0,7604
$DPH_3(6)$	0,2151	33,944	0,6379
$DPH_4(6)$	0,0843	16,750	0,4897
$DPH_5(6)$	0,0949	13,452	0,6860
MW	0,2175	30,618	0,6867
$D_1(8)$	0,1780	23,944	0,8629
$D_2(8)$	0,3296	49,083	0,6623
$D_3(8)$	0,5785	31,444	1,8341
$D_4(8)$	0,5034	42,666	1,1530
$D_5(8)$	0,1316	12,583	1,0431
MW	0,3442	31,944	1,1111
$DPh_1(8)$	0,2712	23,781	1,1848
$DPh_2(8)$	0,0493	6,683	0,7700
$DPh_3(8)$	0,1580	12,742	1,2166
$DPh_4(8)$	0,1045	14,706	0,8579
$DPh_5(8)$	0,3202	21,986	1,4969
MW	0,1806	15,979	1,1052
$DPH_1(8)$	0,9731	91,500	1,0986
$DPH_2(8)$	0,2416	29,694	0,8070
$DPH_3(8)$	0,4808	48,972	1,0070
$DPH_4(8)$	0,3005	36,422	0,8204
$DPH_5(8)$	0,8103	105,695	0,7873
MW	0,5613	62,461	0,9041

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1(10)	0,4001	28,944	1,3699
D_2(10)	0,4320	34,277	1,2527
D_3(10)	1,4002	106,389	1,3232
D_4(10)	0,2085	17,722	1,1496
MW	0,6102	46,833	1,2738
DPh_1(10)	0,1662	23,500	0,7240
DPh_2(10)	0,1312	12,806	0,9463
DPh_3(10)	0,2684	37,278	0,7245
DPh_4(10)	0,4255	22,972	1,9885
DPh_5(10)	0,1511	10,922	1,3880
MW	0,2285	21,496	1,1542
DPH_1(10)	1,1536	80,500	1,4458
DPH_2(10)	0,3218	30,194	1,0785
DPH_3(10)	0,1896	21,056	0,8909
DPH_4(10)	0,9540	65,778	1,4747
DPH_5(10)	1,0603	60,028	1,7693
MW	0,7359	51,511	1,3318
D_1(12)	0,5457	43,556	1,3028
D_2(12)	0,3286	17,775	1,8928
D_3(12)	0,2593	28,639	1,0256
D_4(12)	0,5815	28,833	2,0294
D_5(12)	0,4936	23,083	2,1571
MW	0,4417	28,377	1,6815

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
DPh_1(12)	0,7302	45,8056	1,5559
DPh_2(12)	0,1384	8,3889	1,5350
DPh_3(12)	0,3510	22,0556	1,7985
DPh_4(12)	0,1995	10,5179	2,0297
MW	0,3548	21,6945	1,7298
DPH_1(12)	1,3146	105,6390	1,2934
DPH_2(12)	0,6366	56,8612	1,1162
DPH_3(12)	1,2856	102,0556	1,2504
DPH_4(12)	0,3261	32,7778	1,0152
MW	0,8907	74,3334	1,1703
D_1(16)	0,4239	47,5000	0,8926
D_2(16)	0,7142	31,5278	2,1507
D_3(16)	1,6273	64,2223	2,5231
D_4(16)	0,2014	10,0556	2,0362
D_5(16)	0,4189	17,5278	2,5068
MW	0,6771	34,1667	2,0215
DPh_1(16)	0,5036	33,1667	1,6228
DPh_2(16)	0,2359	10,6945	2,1950
DPh_3(16)	0,3416	24,7500	1,6972
DPh_4(16)	0,3162	32,0834	0,9894
DPh_5(16)	0,8725	34,7500	2,5169
MW	0,4540	27,0834	1,8042

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
DPH_1(16)	0,7432	45,8334	1,5854
DPH_2(16)	0,9692	69,6112	1,3957
DPH_3(16)	0,6177	28,8334	1,6570
DPH_4(16)	1,4356	28,8334	2,0064
DPH_5(16)	0,9758	67,8056	1,8725
MW	0,9488	53,2223	1,7092

Tab. 6 : 6 , 12 und 44 Wochen nach Absetzen einer 7-wöchigen DÄNA-Behandlung mit 1 mg/kg KG DÄNA im Trinkwasser kamen die Tiere zur Auswertung.

6 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(7)$	0,0232	7,46	0,2660
$D_2(7)$	0,1189	15,50	0,7190
$D_3(7)$	0,0648	12,69	0,5278
$D_4(7)$	0,2627	38,18	0,6809
$D_5(7)$	0,1418	13,34	1,0436
MW	0,1222	17,43	0,6475

12 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_6(7)$	0,2089	23,84	0,8692
$D_7(7)$	0,1968	14,20	1,4921
MW	0,2029	19,02	1,1807

44 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_8(7)$	0,8508	16,17	5,4242
$D_9(7)$	1,1150	16,69	8,8683
MW	0,9829	16,43	7,1463

Tab. 7 : 6 , 11 , 15 und 21 Wochen nach einer 10-tägigen DÄNA-Behandlung mit 2 und 4 mg/kg KG (D 2 , D 4) per Schlundsonde kamen die Tiere zur Auswertung.

6 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(2)$	0,1270	26,272	0,5141
$D_2(2)$	0,0697	29,915	0,2709
$D_3(2)$	0,0321	4,687	0,6891
$D_4(2)$	0,3100	36,779	0,7872
$D_5(2)$	0,0606	11,449	0,5049
MW	0,1199	21,820	0,5532
$D_1(4)$	0,2410	43,305	0,5577
$D_2(4)$	0,1155	20,847	0,5529
$D_3(4)$	0,2271	44,915	0,4683
$D_4(4)$	0,1460	27,627	0,5394
$D_5(4)$	0,1330	25,594	0,5108
MW	0,1725	32,458	0,5258

11 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(2)$	0,1805	17,627	1,0476
$D_2(2)$	0,1070	11,355	0,9467
$D_3(2)$	0,4740	51,017	0,9383
$D_4(2)$	0,4975	35,254	1,3616
$D_5(2)$	0,6775	49,746	1,3842
MW	0,3873	32,999	1,1357

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(4)$	0,4940	59,661	0,8313
$D_2(4)$	0,6830	56,356	1,2685
$D_3(4)$	0,4745	40,509	1,1595
$D_4(4)$	0,2800	24,577	1,2052
$D_5(4)$	0,7430	42,458	1,7574
MW	0,5349	44,712	1,2444

15 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(2)$	0,4390	44,746	0,9907
$D_2(2)$	0,1645	23,051	0,6969
$D_3(2)$	0,1885	19,407	0,9746
$D_4(2)$	0,5260	29,068	1,8152
$D_5(2)$	0,2565	21,610	1,3363
MW	0,3149	27,576	1,1627
$D_1(4)$	0,3400	29,237	1,1360
$D_2(4)$	0,3455	25,933	1,3311
$D_3(4)$	0,3160	28,729	1,1905
$D_4(4)$	0,3380	29,068	1,1553
$D_5(4)$	0,4345	36,441	1,1892
MW	0,3548	29,881	1,2004

21 Wochen behandlungsfreies Intervall :

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(2)$	0,3270	14,746	2,2097
$D_2(2)$	0,0503	4,576	1,0798
$D_3(2)$	0,0372	3,475	1,1291
$D_4(2)$	0,5020	17,712	3,0039
$D_5(2)$	0,1215	6,187	1,9908
MW	0,2076	9,336	1,8827
$D_1(4)$	0,7295	47,288	1,5734
$D_2(4)$	1,2815	46,610	2,8168
$D_3(4)$	0,5125	32,712	1,5868
$D_4(4)$	0,3730	20,424	1,8298
$D_5(5)$	0,3300	21,102	1,5951
MW	0,6453	33,627	1,8804

Tab. 8:5x10mg/kg KG DÄNA intraperitoneal und DÄNA gleichzeitig mit Phenobarbital . 38 Wochen behandlungsfreies Intervall . Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,001$.

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1	0,4870	46,29	1,0299
D_2	0,5490	32,69	1,7667
D_3	0,4753	31,11	1,5268
D_4	0,0645	10,15	0,6142
D_5	0,5823	38,89	1,5026
D_6	0,4106	33,06	1,2436
D_7	0,3520	20,96	1,6785
D_8	0,4213	30,18	1,4111
D_9	0,5943	36,85	1,6342
MW	0,4374	31,13	1,3786
s	0,1782	11,64	0,4030
DPh_1	0,1210	12,96	0,9399
DPh_2	0,2223	13,15	1,6868
DPh_3	0,2257	13,98	1,6047
DPh_4	0,1480	23,43	0,6342
DPh_5	0,2993	24,63	1,1945
MW	0,2033	17,63	1,2120
s	0,0996	6,98	0,4324

Tab. 9 : Durchfütterung mit 5 mg/kg KG DÄNA im Trinkwasser (D) und mit DÄNA in Kombination mit Phenobarbital (DPh) über 4 Wochen . Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,001$.

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1	0,316	61,67	0,5136
D_2	0,545	60,19	0,9277
D_3	0,363	47,92	0,7725
D_4	2,163	211,85	1,0233
D_5	0,8513	103,43	0,8283
MW	0,8476	97,01	0,8131
s	0,7099	63,17	0,2011
DPh_1	0,1278	28,89	0,4431
DPh_2	0,0504	13,97	0,3599
DPh_3	0,1090	17,14	0,8028
DPh_4	0,0977	16,28	0,5931
DPh_5	0,0987	21,61	0,4625
MW	0,0967	19,61	0,5323
s	0,0299	7,0	0,2350

Tab. 10 : Durchfütterung mit 0,1 mg/kg KG DÄNA (D) im Trinkwasser und mit DÄNA & Phenobarbital (DPh) über 15 bzw. 25 Wochen (D15 bzw. D25). Behandlungsfreies Intervall 26 bzw. 16 Wochen. Irrtumswahrscheinlichkeit p 0,01 bei D(15)/DPh(15) bzw. p<0,05 bei D(25/DPh(25).

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(15)$	0,7567	34,21	2,2082
$D_2(15)$	1,3334	13,00	10,3657
$D_3(15)$	0,0887	3,47	2,5734
$D_4(15)$	0,0161	1,17	1,2045
MW	0,5487	12,96	4,0879
s	0,5721	13,68	3,9367
$DPh_1(15)$	0,0921	7,24	0,8547
$DPh_2(15)$	0,1310	7,47	1,7181
$DPh_3(15)$	0,0027	0,37	0,2440
$DPh_4(15)$	0,0823	4,88	2,1432
MW	0,0770	4,99	1,2390
s	0,0648	4,31	1,0480

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_1(25)$	2,8877	72,86	4,3144
$D_2(25)$	0,1579	7,85	2,0787
$D_3(25)$	0,6650	24,59	2,7399
MW	1,2366	35,10	3,0443
s	1,2615	29,43	1,0750
$DPh_1(25)$	0,1125	4,81	2,5560
$DPh_2(25)$	0,1737	6,32	2,6845
$DPh_3(25)$	0,0512	4,73	1,0602
MW	0,0844	3,97	1,5751
s	0,0775	2,84	1,300

Tab. 11 : Durchfütterung mit 8 mg/kg KG DÄNA (D) per Schlundsonde und mit DÄNA & Methylcholanthren (DMC) über 4 Wochen. Behandlungsfreies Intervall 8 Wochen. Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,001$.

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1	3,1070	176,24	1,7804
D_2	1,4384	75,75	1,8918
D_3	2,5659	110,73	2,2221
D_4	3,8321	131,43	2,9467
D_5	4.2968	198,76	2,1621
D_6	1,7940	99,83	1,8013
D_7	3,6478	122,29	2,9917
D_8	3,7490	169.93	2,2134
D_9	2,1136	92,39	2,2514
D_{10}	3,2905	124,36	2,6529
MW	2,9835	130,77	2,2914
s	o.9654	40,20	0,4655
DMC_1	0.7683	63,14	1,2156
DMC_2	1,6067	70,83	2,2858
DMC_3	1,1622	65.73	1,7667
DMC_4	1.5305	78,27	1,9536
DMC_5	1,5685	95,09	1,6577
DMC_6	o.9729	57,54	1,7019
MW	1,2681	71,77	1,7636
s	0,3585	14,00	0,3679

Tab. 12 : Durchfütterung von 5 mg/kg KG DÄNA (D) per Schlundsonde und DÄNA & Halothan (DH) über 4 Wochen. Behandlungsfreies Intervall 5 Wochen. Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,03$. $D_{1-3}(4)$ siehe Tab. 3.

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
$D_{1-3}(4)$	0,4768	88,951	0,5486
s	0,1696	22,869	0,1636
DH_1	2,4030	188,520	1,2769
DH_2	0,4770	74,440	0,6453
DH_3	1,0900	140560	0,7726
DH_4	0,2130	32,220	0,6690
DH_5	0,9320	94,350	0,9914
DH_6	0,7750	117.130	0,6637
DH_7	0,5660	75,370	0,7439
DH_8	2,1270	123,240	1,7197
DH_9	2,3130	174,070	1,3290
DH_{10}	0,7690	108,240	0,7091
MW	1,1660	112,810	0,9521
s	0,7901	47,273	0,3631

Tab. 13 : 5 x 10 mg/kg KG DÄNA (D) intraperitoneal und DÄNA & Halothan . 38 Wochen behandlungsfreies Intervall . Irrtumswahrscheinlichkeit $p<0,001$. D_{1-9} siehe Tab.8 .

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_{1-9}	0,4374	31,13	1,3786
s	0,1782	11,64	0,4030
DH_1	0,9473	47,04	1,9958
DH_2	0,8993	47,04	1,9464
DH_3	0,8853	50,18	1,8472
DH_4	0,6807	38,43	1,7589
MW	0,8532	45,67	1,8871
s	0,1800	8,59	0,34

Tab. 14 : 5 x 10 mg/kg KG DÄNA (D) , DÄNA & SKF 525 A (DS) und DÄNA & SKF 525 A & Phenobarbital (DSPh). DÄNA-Applikation und behandlungsfreies Intervall siehe Tab.8 .

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_{1-9}	0,4374	31,13	1,3786
s	0,1782	11,64	0,4030
DS_1	0,5893	46,57	1,4418
DS_2	0,3090	12,89	2,5387
DS_3	0,3077	12,40	2,5836
DS_4	0,3513	46,02	0,7804
DS_5	0,2140	14,92	1,4093
MW	0,3540	26,56	1,7508
s	0,1793	17,78	1,0577
$DSPh_1$	0,946	39,07	2,4212
$DSPh_2$	0,1537	10,77	1,3982
$DSPh_3$	0,1937	15,91	1,2949
$DSPh_4$	0,1823	9,96	1,7948
MW	0,3689	18,93	1,7273
s	0,3532	13,00	0,5452

Tab. 15 : Intervallbehandlung mit 4 x 20 mg/kg KG DÄNA (D), DÄNA & Phenobarbital (DPh), DÄNA & Phenobarbital & SKF 525 A (DSPh) und DÄNA & SKF 525 A (DS) in monatlichen Abständen. Behandlungsfreies Intervall 15 Wochen . Irrtumswahrscheinlichkeit für D/DPh $p<0,001$, für D/DS $p<0,001$.

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_1	0,9877	28,43	3,8764
D_2	0,4442	20,23	2,3165
D_3	0,3503	20,52	1,8371
D_4	0,7165	39,38	1,8512
D_5	0,1145	6,39	1,8130
D_6	0,5789	29,20	1,9431
D_7	0,2457	18,89	1,2465
D_8	1,0850	48,57	2,2976
D_9	0,6774	40,46	1,7699
D_{10}	0,6456	17,65	3,6456
MW	0,5846	26,87	2,2597
s	0,3285	14,75	1,06

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
DPh_1	0,239	24,54	0,9338
DPh_2	0,324	24,70	1,3310
DPh_3	0,409	25,35	1,6651
DPh_4	0,294	11,90	2,5474
DPh_5	0,247	18,12	1,4358
DPh_6	0,242	14,95	1,6014
DPh_7	0,511	27,70	1,8647
DPh_8	0,068	5,08	1,1804
MW	0,292	19,04	1,5700
s	0,142	8,67	0,5902
$DSPh_1$	0,4114	17,98	2,3319
$DSPh_2$	0,3403	28,68	1,1910
$DSPh_3$	0,5998	42,31	1,4152
$DSPh_4$	0,7572	53,56	1,4337
MW	0,5346	35,63	1,5930
s	0,1846	15,15	0,4886
DS_1	3,9754	169,45	2,4024
DS_2	1,7598	11,91	1,6017
MW	2,8676	140,18	2,0021
s	1,2299	39,88	0,5367

Tab. 16 : 5 x 10 mg/kg KG DÄNA (D) intraperitoneal,
DÄNA & Metyrapon (DM) und DÄNA & $CoCl_2$ (DCo).
38 Wochen behandlungsfreies Intervall.
Irrtumswahrscheinlichkeit für D/DM $p<0,001$,
für D/DCo $p=0,06$. D_{1-9} siehe Tab.8 .

Tier	% Inselgewebe	Inselzahl/cm^2	mm^2/Insel $x10^{-2}$
D_{1-9}	0,4374	31,13	1,3786
s	0,1782	11,64	0,4030
DM_1	1,7747	81,30	2,1315
DM_2	0,7107	60,28	1,1693
DM_3	0,9043	41,67	2,2026
DM_4	0,8280	48,05	1,7533
DM_5	0,7972	40,65	2,0037
MW	1,003	54,39	1,8521
s	0,4369	17,00	0,5226
DCo_1	0,4968	23,83	2,1840
DCo_2	0,6653	34,26	1,9504
DCo_3	0,8617	29,35	2,9498
DCo_4	0,2436	31,60	0,7187
MW	0,5669	29,76	1,9507
s	0,2600	7,28	0,9700

Tiergruppe	Alkylierung		P 450 Gehalt		b 5 Gehalt		DMNA Demethylierung Formaldehydumsatz		Nitroanisol Demethylierung p-Nitroanisolumsatz		Alkylierung / Formaldehydumsatz
	dpm/mg Protein	%	nMol/mg Protein	%	nMol/mg Protein	%	mμ Mol mg Protein	%	mμMol mg Protein x10^3xmin.	%	
Kontrolle	1888,5	100	0,6191	100	0,6214	100	2,152	100	0,6986	100	1
D_2	2574	136,3	0,5676	91,7	0,6267	101	2,193	102	0,6574	94,1	1,336
DPh_2	1707	90,4	1,2118	195,7	0,7708	124	7,588	353,6	2,2845	327	0,256
DH_2	2780	147,2	0,7234	117	0,6557	106	2,645	123	0,7758	111	1,197
D_{10}	1961	103,8	0,5808	93,8	0,5947	95,7	2,538	118	1,1765	168	0,88
DPh_{10}	1799	95,3	1,5972	258	0,8920	143,5	8,816	410	5,4412	778,8	0,232
DH_{10}	7595	402,2	0,6336	1o2,3	0,6404	103	3,270	152	1,3676	195,8	2,65

Tab. 17 : Alkylierung microsomaler Proteine durch DMNA,Cytochrom P 450 und -b 5 Gehalte, DMNA- und Nitroanisol-Demethylierung einer unbehandelten Kontrollgruppe sowie nach 2 und 10 tägiger Applikation von 5 mg/kg KG DÄNA pro Tag,alleine und in Kombination mit DÄNA und Halothan.

6 . LITERATURVERZEICHNIS

ANDERS,M.W. and G.J.MANNERING : Inhibition of drug metabolism. Mol.Pharmacol. 2, 319-327 (1966)

ANDERSON,L.E.,W.O.McLURE : An improved scintillation cocktail of high-solubilizing power. Analyt.Biochem.51,173 (1973).

APPEL,K.E. : Bedeutung der Cytochrom P 450-Funktion für Metabolismus,Alkylierungsintensität und carcinogene Wirksamkeit von Dimethylnitrosamin. Dissertation Fachbereich Pharmazie Tübingen 1976

ARCOS,J.C.,D.L.DAVIS,C.E.L.BROWN and M.S.ARGUS : Repressible and inducible enzymic forms of DMNA-demethylase. Z. Krebsforsch. 89,181-199 (1977).

BANNASCH,P.,H.ANGERER : Glykogen und Glukose-6-Phosphatase während der Kanzerisierung der Rattenleber durch N-Nitrosomorpholin. Arch. Geschw.forsch. 43,2105-2114 (1972).

BARON,J.,A.G.HILDEBRANDT,J.A.PETERSON and R.W.ESTABROOK : The role of oxygenated P 450 and of cytochrome b 5 in hepatic microsomal drug oxidations. Drug metabolism and disposition 1 129-134 (1973).

BARTSCH,H.,C.MALAREILLE,R.MONTESANO : In vivo metabolism and microsome-mediated mutagenicity of dialkylnitrosamines in rat,hamster and mouse tissues. Cancer Res. 35, 644 (1975).

BERMAN,M.C.,K.M.IVANETICH and J.E.KENCH : The effects of halothane on hepatic microsomal electron transfer. Biochem.J. 148, 179 (1975).

BÖRNER,P. : Vergleichende Untersuchungen des Verlustes von Glukose-6-Phosphatase und serologischer Spezifität in Leberzellen der Ratte während der beginnenden Cancerogenese. Z.Naturforsch. 236,1082-1084 (1968).

BÖRNER,P.,W.GÖSSNER : Enzymhistochemische Untersuchungen der Adenosintriphosphatase,der Succinodehydrogenase sowie der alkalischen und sauren Phosphatase im Leberparenchym der Ratte während der Einwirkung des Carcinogens Diäthylnitrosamin. Z.Naturforsch. 236,1085-1091 (1968).

BUCHER,M.D.,NANCY,L.R. : Experimental aspects of hepatic regeneration. The New England Journal of Medicine 277,686-695 (1967).

CHIQUOINE,A.D. : Distribution of Glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse . J.Histochem.Cytochem. 1,429-435 (1953).

CHIQUOINE.A.D. : Further studies on the histochemistry of Glucose-6-phosphatase . J.Histochem.Cytochem. 3, 471-477,(1955).

CONNEY,A.H.,E.C.MILLER,J.A.MILLER : The metabolism of methylated aminoazo dyes. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. Cancer Res. 16,450 (1956).

COOK,L.,NAVIS,G.J.,J.J.TONER and F.J.FELLOWS :
Potentiation of certain analgesic drugs by ß-diethylaminoethyldiphenylpropylacetate-hydrochloride (SKF 525 A)
Fedn.Proc. 12,313 (1953).

CORREIA,M.A.,G.J.MANNERING : DPNH synergism of TPND-dependent mixed function oxidase reactions.
Drug metabolism and disposition 1,139 (1973).

CRAMER,J.W.,MILLER,E.C.MILLER : The hydroxylation of the carcinogen 2-acetylaminofluorene by rat liver. Stimulation by treatment in vivo with 3-methyl-cholanthrene.
J.Biol.Chem. 235,250 (1960).

CZYGAN,P.,H.GREIM,J.A.GARRO,F.HUTTERER,F.SCHAFFNER, H.POPPER,O.ROSENTHAL and Y.D.COOPER :
Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P 450 dependency of its activation to a mutagen.
Cancer Res. 33, 2983-2986 (1973).

DRUCKREY,H.,A.SCHILDBACH,D,SCHMÄHL,R.PREUSSMANN,S.IVANKOVIC :
Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von DÄNA .
Arzneimittelforsch. 13,841-851 (1963).

DRUCKREY,H.,R.PREUSSMANN,N.NASHED,S.IVANKOVIC :
Carcinogene alkylierende Substanzen.I.Dimethylsulfat, carcinogene Wirkung an Ratten und wahrscheinliche Ursache von Berufskrebs.
Z. Krebsforsch.68, 103 (1966).

DRUCKREY,H.,R.PREUSSMANN,S.IVANKOVIC,D.SCHMÄHL :
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforsch. 69,103-201 (1967).

DUTTON,A.H.,D.F.HEATH :Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice.
Nature,178,644 (1956).

DUTTON,A.H.,D.F.HEATH : The preparation of ^{14}C-Dimethylamine and ^{14}C-Dimethylnitrosamine.
J.Chem.Soc. 1892 (1956) Part.II

EISENBRANDT,G.,P.MARQUARDT : Über die Problematik des Vorkommens von N-Nitrosoverbindungen in der Nahrung.
Medizin und Ernährung 10, 73 (1969).

FISKE,C.H.,Y.SUBBAROW : The colorimetric determination of phosphorus.
J.Biol.Chemistry,66 375-400 (1925).

FISCHER,C.,E.WEILER: Die histochemische Darstellung des leberspezifischen Antigens und dessen Schwund in Hepatomen mit Hilfe fluorescinmarkierten Antikomplements.
Z. Krebsforsch. 64,441-447 (1962).

FRIEDRICH-FREKSA,H.,G.PAPADOPULU,G.GÖSSNER :
Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von DÄNA.
Z. Krebsforsch.,72,226-238 (1969).

GELBOIN,H.V.,N.R.BLACKBURN : The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues.Inhibition by actinomycin D and puromycin.
Cancer Res.,24,356 (1964).

FRIEDRICH-FREKSA,H.,G.PAPADOPULU,G.GÖSSNER :
Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin .
Z. Krebsforsch.,72,240-253 (1969).

GEISSLER,E. : Über die Wirkung von Nitrosaminen auf Mikroorganismen.
Naturwissenschaften 49 , 380-381 (1962).

GERCHMANN,L.L.,D.B.LUDLUM : The properties of 6-O-methylguanine in templates for RNA polymerase.
Biochem.Biophys.Acta, 308, 310 (1973).

GÖSSNER,W.,H.FRIEDRICH-FREKSA : Histochemische Untersuchungen über die Glukose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.
Z.Naturforsch.,19 b,862-963 (1964).

GREIM,H. : Karzinogene Umweltstoffe.
Deutsche Med.Wochenschrift,99 Nr.29,1538-1541 (1974).

HARPER,A.E. : Glukose-6-Phosphatase.
In : Methoden der enzymatischen Analyse, von H.U.BERGMEYER ,Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstraße 344 , (1962).

HOCH-LIGETI,C.,M.F.ARGUS,J.C.ARCOS : Combined carcinogenic effects of Dimethylnitrosamine and 3-Methylcholanthrene in the rat.
J.Nat.Canc.Inst.,40 , 535 (1968)

KRÜGER,F.W. : Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen alkylierender und carcinogener Wirkung.
Habilitationsschrift Fachbereich f.naturwiss.Medizin Heidelberg (1971) .

KRÜGER,F.W. : Metabolismus von Nitrosaminen in vivo .
Z. Krebsforsch.,76,145-154 (1971).

KRÜGER,F.W.,B.BERTRAM : Metabolism of nitrosamines in vivo.
Z. Krebsforsch.,80 (1973).

KUNZ,W.,G.SCHAUDE,A.SCHIMASSEK,W.SCHMID,M.SIESS :
Stimulation of liver growth by drugs.II.Biochem.
Analysis.
Proceed.of the Europ.Soc.f.the study of Drug
Toxicity,Vol. 7 ,138-153 (1966).

KUNZ,W.,G.SCHAUDE,W.SCHMID,M.SIESS : Lebervergrösserung
durch Fremdstoffe.
Arch.Pharmak. exper.Path.,254, 470-488 (1966).

KUNZ,W.,G.SCHAUDE,M.SIESS : Die Beeinflussung der Nitrosamin-
carcinogenese durch lebervergrössernde Pharmaka.
Berichte des Eur.Canc.Meeting,Wien,183. (1967).

KUNZ,W.,G.SCHAUDE,C.THOMAS : Die Beeinflussung der
Nitrosamincarcinogenese durch Phenobarbital und
Halogenkohlenwasserstoffe.
Z. Krebsforsch.,72,291 (1969).

LEIBMAN,K.C.:Effects of metyrapone on liver microsomal drug
oxidations.
Mol.Pharm. 5,1 (1969).

LEIBMAN,K.C.,E.ORITZ : Metyrapone and other modifiers
of microsomal drug metabolism.
Drug metabolism and Disposition 1 ,185-189 (1973).

LIJINSKY,M : Reactions of drugs with nitrous acid as source
of carcinogenic nitrosamines.
Canc. Res.,34,255-258 (1974).

LIJINSKY,M.,H.W.TAYLOR,C.SNYDER,P.NETTESHEIM : Malignant
tumors of liver and lung in rats fed Aminopyrine
or Heptamethylene together with Nitrite.
Nature 244,176 (1973).

LOWRY,O.H., N.J.ROSEBROUGH,A.L.FARR,R.J.RANDALL :
Proteine measurement with the Folin Phenol reagent.
J.Biol.Chem.,193 , 265 (1951).

MAGEE,P.N., J.M.BARNES : The production of malignantprimary hepatic tumor in the rat by feeding dimethyl-nitrosamin.
Brit.J.Canc.,10,114-122 (1956).

MAGEE,P.N.,J.M.BARNES : The experimental production of tumors in the rat.
Acta Unio Internat.Contra Cancrum,15,187-190 (1959).

MAGEE,P.N.,E.FARBER : Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver acids by dimethylnitrosamin in vivo.
Biochem.J.,83,114-123 (1962).

MAKIUARA,S.,H.AOE,S.SUGIHARA,K.HIRAO,M.ARAI,N.ITO :
Inhibitory effect of polychlorinatad biphenyls on liver tumorigenesis in rats treated with 3'-Methyl-4-dimethylamino-azobenzene, N-2-Fluorenylacetamide and Diethylnitrosamine.
J.Nat.Canc.Inst.,53,1253 (1974).

MANNERING,G.J. : Irreversible combination of SKF 525 A with the type I binding site of microsomal hemoproteine.
Internat.Sympos.on Microsomes and Drug Oxidations, Tübingen (1969).

MANSUY,D.,W.NASTAINCZYK,V.ULLRICH : The mechanism of halothane binding to microsomal Cytochrome P 450.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharm.285,315 (1974).

MIETKIEWSKI,K.,F.DOMKA,L.MALENDOWICZ,J.MALENDOWICZ : Studies on ATP hydrolysis in medium for histochemical demonstration of ATP'ase activity . Histochemie , 24,343-353 (1970) .

MIRVISH,S.S. : Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis . J.Nat.Canc.Inst.,44,633 (1970) .

MIRVISH ,S.S.,B.GOLD,M.EAGEN,S.ARNOLD : Kinetics of the nitrosation of aminopyrin to give dimethynitrosamine. Z. Krebsforsch.,82 , 259 (1974).

MONTESANO,R.,H.BARTSCH : Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds : possible environmental hazards . Mutation Research , 32 , 179-228 (1976) .

NASH,T. : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction . Biochem.J.,55, 416 (1953) .

NETTER,K.J. : Proc. 1st Inter. Pharmacol. Meeting , Stockholm , Pergamon , 6 , 213 (1962).

NETTER,K.J. : Effects of inhibitors on drug metabolism . Drug metabolism and disposition 1 ,162-163 (1973).

NISHIZUMI,M. : Enhancement of diethylnitrosamin hepatocarcinogenesis in rats by exposure to polychlorinated biphenyls or phenobarbital . Cancer Letters , 2 , 11-16 (1976) .

O'CONNOR,P.J.,CAPPS,M.A.,A.W.CRAIG,P.D.LAWLY,S.A.SHAH : Differences in tne patterns of methylation in rat liver ribosomal RNA after reaction in vivo with methyl-methanesulphonate and NN-DMNA . Biochem.J.,129, 519-528 (1972) .

OMURA,T.,R.SATO : The carbon-monoxide-binding pigment of liver microsomes .
J.Biol.Chem.,239 , 2379 (1964) .

PERAINO,C.,R.J.M.FRY,E.STAFFELDT: Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene .
Cancer Res.,31, 1506-1512 (1971) .

PERAINO,C.,R.J.M.FRY,E.STAFFELDT,J.P.CHRISTOPHER : Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital,diphenylhydantoin and dichlorodiphenyl-trichloroethane on 2-acetylaminofluorene induced hepatic tumorigenesis in the rat .
Cancer Res.,35 , 2884-2890 (1975) .

PETERSON ,J.A.,V.ULLRICH,A.G.HILDEBRANDT : Metyrapon interaction with Pseudomonas pudida Cytochrome P 450 .
Arch.Biochem.Biophys.,145 531 (1971) .

PITOT,H.C.,POTTER,V.R.,H.P.MORRIS : Metabolic adaptations in rat hepatomas.I.The effect of dietary protein on some inducible enzymes in liver and hepatome 5123C.
Cancer Res.,21, 1001-1008 (1961).

PRATT,O.E. : Some factors affecting rat brain phosphatase activity in fresh tissue suspensions and in histochemical methods .
Biochem.Biophys.Acta , 14,380-389 (1954).

RAO,K.V.N.,S.D.VASSELINOVITCH : Age and sex-associated DÄNA dealkylation activity of the mouse liver and hepatocarcinogenesis .
Cancer Res.,33 , 1625-1627 (1973) .

REMMER , H. : Der beschleunigte Abbau von Pharmaka unter dem Einfluß von Luminal .
Arch.exp.Path.Pharmakol.,235 , 279 (1959) .

REMMER , H. : Drug tolerance
In:CIBA Foundation Symp.on Enzymes and Drug Action, London , p. 276 (1962) .

REMMER,H. und H.J.MERKER : Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital .
Klin.Wochenschrift,41, 276-282 (1963) .

REMMER,H. : Drug-induced formation of the smooth endoplasmatic reticulum and of drug metabolizing enzymes.
Proceed. of the Europ.Sec.f.the study of drug toxicity , Vol.4 , 57 (1964) .

REMMER,H.,H.J.MERKER : Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug-metabolizing enzymes .
Ann.N.Y.Acad.Sci.,123 ,79 (1965) .

REMMER,H. : Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver .
Europ.J.Clin.Pharmacol.,5 , 116-136 (1972) .

RICKART,R. : Persönliche Mitteilung (1974) .

SALZMANN,U. : Untersuchungen über Vorkommen und Lokalisation von Dimethylnitrosamin-metabolisierenden Enzymen im Kernkompartiment von Leberzellen .
DiplomarbeitFachbereich Biologie Tübingen (1977).

SANDER,J.,F.SEIF : Bakterielle Reduktion von Nitrat im Magen des Menschen als Ursache einer Nitrosaminbildung .
Arzneim.Forsch.,19 , 1091 (1969) .

SANDER,J. : Nitrosaminsynthese durch Bakterien .
Z.Physiol. Chem.,349, 429 (1968).

SCHAUER,A.,E.KUNZE : Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin .
Z.Krebsforsch.,70,252-266 (1968) .

SCHENKMANN,J.B.,B.J.WILSON,D.L.CINTI : SKF 525 A - in vivo and in vitro effects of metabolism by rat liver microsomes-formation of an oxygenated complex .
Biochem.Pharm.,21 , 2373-2383 (1972) .

SCHERER,E.,G.HOFFMANN : Probable clonal genesis of cellular islands induced in rats liver by diethylnitrosamine.
Europ.J.Cancer , 7 ,369-371 (1971) .

SCHIEFERSTEIN,G.,J.PIRSCHEL,W.FRANK,H.FRIEDRICH-FREKSA : Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von DÄNA .
Z.Krebsforsch.,82,191-208 (1974) .

SCHIMASSEK,H.,W.KUNZ,D.GALLWITZ : Differentiation of liver metabolism on the molecular level during chronic application of halothane .
Biochem.Pharmakol.,15 , 1957-1964 (1966) .

STEWART,B.W.,P.N.MAGEE : Effect of a single dose of dimethylnitrosamine on biosynthesis of nucleic acid and protein in rat liver and kidney .
Biochem.J.,125 , 943-952 (1971) .

STIER,A.,W.KUNZ,A.K.WALLI,H.SCHIMASSEK : Effects on growth and metabolism of rat liver by halothane and its metabolite trifluoroacetate .
Biochem.Pharmacol.,21 , 2181-2192 (1972) .

SWANN,P.F.,P.N.MAGEE :Nitrosamine induced carcinogenesis.
Biochem.J.,125 , 841-847 (1971) .

TEPHLY,T.R.,P.HIBBELN :The effect of cobalt chloride administration on the synthesis of hepatic microsomal Cytochrome P 450 .
Biochem.Biophys.Res.Comm.,42 , No.4 589 (1971).

WACHSTEIN ,M.,E.MEISEL : On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase .
J.Histochem.Cytochem.,4,592 (1956).

WACHSTEIN,M.,E.MEISEL : Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi.
Americ.J.Clin.Path.,27 , 13-23 (1957).

WACHSTEIN,M.,E,MEISEL,A.NIEDZWIEDZ : Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphatase technique.
J.Histochem.Cytochem.,8,387-388 (1960).

WEBER,G.,A.CANTERO : Glucose-6-phosphatase activity in normal,precancerous and neoplastic tissues.
Cancer Res.,15,105-108 (1955).

WEILER,E.: Die Änderung der serologischen Spezifität von Leberzellen der Ratte während der Carcinogenese durch p-Dimethylaminoazobenzol .
Z.Naturforsch.,116 , 31-38 (1956).

WEISBURGER,J.H.,R.M.MADISON,J.M.WARD,C.VIGUERA,E.K.WEISBURGER : Modification of diethylnitrosamin liver carcinogenesis with phenobarbital but not with immunosuppression.
J.Nat.Cancer Inst.,54 , 1185-1188 (1975).

L E B E N S L A U F

Am 23. September 1952 wurde ich, Gerhard Stöckle, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Leonhard Stöckle und dessen Ehefrau Anna Stöckle geb. Gruß in Geislingen an der Steige geboren.

Mein Vater verstarb 1964.

Nach vierjährigem Besuch der Grundschule und neunjähriger Schulausbildung am Gymnasium Geislingen absolvierte ich dort 1971 das Abitur. Im Wintersemester 1971/72 nahm ich in Tübingen das Medizinstudium auf, wo ich 1972 das Vorphysikum, 1973 das Physikum, 1974 den ersten, 1976 den zweiten und am 12.10. 1977 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand.

Die vorliegende Dissertation fertigte ich im Institut für Toxikologie der Universität Tübingen in der Zeit von 1974 bis 1977 an.

Ab Oktober 1976 arbeitete ich als Internatsstudent je vier Monate in der Medizinischen, Gynäkologisch-Geburtshilflichen und Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen.

Nach meiner Approbation im Oktober 1977 begann ich am 1. November 1977 mit der Internistischen Facharztausbildung in der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten :

Adam, Apitz, Arnold, Aulhorn, Bachmann, Bader, Benöhr, Bentrup, Berg, Betz, Bichler, Bierich, H.E.Bock, K.W.Bock, Bohle, Bolt, Braun, Breuninger, Breyer-Pfaff, Cain, Dölle, Domres, Driesen,Durst, Eggstein, Feine, Feneis, Fichtner, Fischbach, Fischer, Flach, Frommhold, Geisbe, Gekeler, Geppert, Gerth, Göbel, Graumann, Greim, Grell, Guglielmi, Gupta, Haasis,Haberlandt, Habermalz, Hammacher, Harms, Haselmann, Hayduk, Heimann, Helms, Heni, Hilpert, Hirsch, Hoffmeister, Jacob, Jeschke, Junger, Kallee, Kidess, Kieninger, Kochsiek, König, Koslowski, Kummer, Kunz, Kretschmer, Krüger, Larbig, Lempp, Lenz, Lüders, Malchow, Mallach, Mau, Mayer, Mentzel, Meyer, Michaelis, Mörike, Ochsenfahrt, Oldenkott, Peiffer, Pfaff, Pflug, Plester, Probst, Reichenmiller, Riethmüller, Ritter, Roemer, Rössler, Rüdorff, Ruoff, Sander, Sasse, Schaude, Schindler, Schneider, Schoenemann, Schorer, Schubert, Schweizer, Schwemmle, Seif, Sewing, Siess, Staak, Stähler, Steinbach, Stunkat, Uehleke, Ullmann, Veihelmann, Völter, Waller, Weichart, Weitzel, Weser, Wessing, Winne .

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791